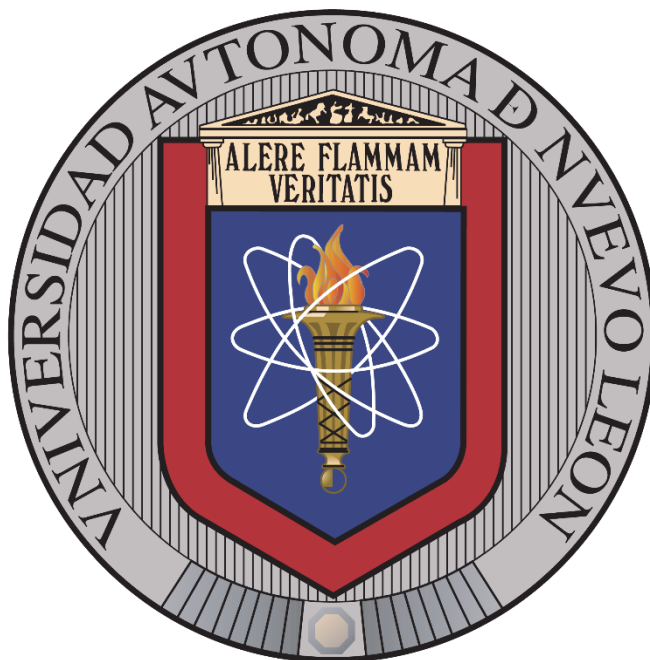


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



“Comparación de la producción de biopolímeros extracelulares de alta densidad y lípidos intracelulares a partir de la microalga *Neochloris oleoabundans*”

Por:

QFB. ANA PATRICIA GARZA CHAPA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRA EN CIENCIAS con orientación en MICROBIOLOGÍA APLICADA.

Agosto 2020

**“COMPARACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPOLÍMEROS
EXTRACELULARES DE ALTA DENSIDAD Y LÍPIDOS INTRACELULARES
A PARTIR DE LA MICROALGA *Neochloris oleoabundans*”**

Comité de Tesis:

Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

COMITÉ TUTORIAL

Dr. José Rubén Morones Ramírez

COMITÉ TUTORIAL

DEDICATORIA

A mi familia

Mayela L. Chapa Guajardo

Cynthia M. Garza Chapa

Katia L. Garza Chapa

Por todo su apoyo y amor brindado durante este camino y la vida.

A mi padre

Fernando C. Garza Benavides (QEPD)

Por el amor y el apoyo que me diste en vida. Te adelantaste en el camino, pero sigues presente en nuestros corazones.

A mi novio

Fernando Sánchez Chapa

Por tu amor, comprensión y apoyo incondicional durante todos estos años, gracias por compartir estos momentos importantes de mi vida a tu lado.

A mis gatitos

Luna y Gordo

Por todo el amor que me dan día con día.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Alma Elizabeth Gómez Loreda, por ser mi guía en esta nueva etapa académica, por darme excelentes consejos, por su apoyo y su paciencia, tanto en lo académico como en lo personal. Gracias por enseñarme el camino de la ciencia con esa pasión y dedicación que puede percibirse desde lejos, gracias infinitas.

Quiero agradecer a mi comité tutorial, a la Dra. Pilar del Carmen Morales San Claudio, al Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño y al Dr. José Rubén Morones Rodríguez por sus consejos y su atención durante el desarrollo del proyecto, gracias totales.

También quiero expresar un profundo agradecimiento a la Dra. Nydia Estrellita Buitimea Cantúa y a todo el equipo de trabajo del laboratorio de CIDPRO en el Tec de Monterrey por darme la oportunidad de trabajar con ellos, por su interés en el proyecto, por el apoyo y sus consejos, muchas gracias.

Gracias a mis amigas, Alexia y Aglaeé, por llenar de alegría este camino, por hacer más ameno los días de estrés, por el apoyo que me brindaron durante estos dos años, por sus consejos en todos los ámbitos de la vida, por siempre estar ahí cuando lo necesite, las quiero mucho, ustedes saben lo importantes que son para mí.

Gracias a los profesores, al coordinador y a la subdirección del posgrado, así como a mis compañeros de maestría y doctorado, por ayudarme con una sonrisa cuando les pedí algún consejo o cuando me resolvieron alguna duda, gracias por aportar ese granito de arena que fue de suma importancia para la realización de este proyecto.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue realizado gracias al apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca proporcionada (CVU 932082) y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL) por permitir realizar este proyecto en sus instalaciones y continuar con mi desarrollo académico y profesional.

Gracias al Programa de Apoyo a la Investigación Científica Tecnológica (PAICYT) de la UANL para la realización de este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
NOMENCLATURA.....	IV
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT	VII
CAPÍTULO 01. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 02. ANTECEDENTES	4
2.1 <i>Neochloris oleoabundans</i>	4
2.2 Lípidos	6
2.2 Exopolisacáridos	9
CAPÍTULO 03. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
3.1 Hipótesis	12
3.2 Objetivos.....	12
3.3 Aportación científica	12
CAPITULO 04. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1 Plan de trabajo general del proyecto de investigación.....	13
4.2 Disposición de residuos	14
4.3 Materiales	14
4.4 Reactivos.....	14
4.5 Equipos	15
4.6 Realización del Proyecto	15
4.7 Montaje de las instalaciones para la incubación.	15
4.8 Preparación de medio de cultivo.....	16
4.9 Adaptación de la microalga <i>Neochloris oleoabundans</i>	17
4.10 Diseño experimental en la preparación de medios de cultivo mixotróficos. .	18
4.11 Incubación de <i>N. oleoabundans</i> en medios de cultivo mixotróficos y medición del crecimiento celular.	19
4.12 Obtención de biomasa de los cultivos de <i>N. oleoabundans</i>	21
4.13 Extracción de lípidos a partir de la biomasa de <i>N. oleoabundans</i>	22
4.14 Extracción de exopolisacáridos.....	23

CAPITULO 05. RESULTADOS	25
5.1 Diseño experimental exploratorio 2^k de cultivos mixotróficos	25
5.2 Incubación de <i>Neochloris oleoabundans</i> en medios mixotróficos y crecimiento celular.	25
5.3 Obtención de biomasa.	29
5.4 Extracción de lípidos intracelulares.	30
5.5 Extracción de exopolisacáridos.	32
CAPÍTULO 06. DISCUSIÓN	33
6.1 Crecimiento celular y generación de biomasa en cultivos mixotróficos.	33
6.2 Producción de lípidos en medios de cultivo mixotróficos.	35
CAPÍTULO 07. CONCLUSIONES.....	37
CAPÍTULO 08. PERSPECTIVAS	38
CAPÍTULO 09. MATERIAL SUPLEMENTARIO	39
CAPÍTULO 10. BIBLIOGRAFÍA.....	41
CAPÍTULO 11. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	46

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Productos a partir de microalgas de alto valor industrial.	1
Tabla 2. Taxonomía de <i>Neochloris oleoabundans</i> y <i>Ettlia oleoabundans</i> .	4
Tabla 3. Composición molecular de exopolisacáridos aislados a partir de microalgas verdes.	11
Tabla 4. Composición del medio de cultivo base de agua dulce descrito por Salim <i>et al.</i>	16
Tabla 5. Diseños experimentales exploratorios 2 ^k realizados en la preparación de medios de cultivo mixotróficos.	18
Tabla 6. Valores obtenidos de la cinética de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz en los medios de cultivo mixotróficos.	27
Tabla 7. mg de Biomasa seca (DW) obtenida por liofilización de los medios de cultivo mixotróficos preliminares (100 mL).	30
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento obtenido de la extracción de lípidos intracelulares de los medios de cultivo mixotróficos preliminares (100 mL).	31
Tabla 9. Biomasa de diferentes microalgas verdes producidas en condiciones mixotróficas.	34
Tabla 10. Mediciones de la concentración celular de <i>Neochloris oleoabundans</i> en medios de cultivo mixotróficos.	39

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido y transmisión respectivamente de las células de <i>N. Oleoabundans</i> tomadas por Rashidi y Trindade.	5
Figura 2. Representación de EPS en células de microalgas.	10
Figura 3. Esquema de las etapas generales del proyecto de investigación	13
Figura 4. Montaje del sistema de luz LED en la incubadora LabTech para el crecimiento de la microalga verde.	16
Figura 5. Esquema de preparación de medio de cultivo base de agua dulce.	18
Figura 6. Esquema de adaptación de la microalga <i>Neochloris oleoabundans</i> .	18
Figura 7. Esquema del diseño experimental 2k en medios mixotróficos.	19
Figura 8. Representación de los cuadrantes contados en la cámara de Neubauer para determinar la concentración celular de <i>Neochloris oleoabundans</i> .	20
Figura 9. Esquema de inoculación y conteo celular de cultivos mixotróficos de <i>N. oleoabundans</i> .	21
Figura 10. Esquema de obtención y conservación de biomasa y sobrenadante de los cultivos mixotróficos de <i>N. oleoabundans</i> .	22
Figura 11. Esquema de extracción de lípidos intracelulares a partir de la biomasa de <i>Neochloris oleoabundans</i> .	23
Figura 12. Procedimiento para la extracción de exopolisacáridos de los medios de cultivo mixotróficos.	24
Figura 13. Crecimiento de <i>Neochloris oleoabundans</i> en medios mixotróficos preliminares (100 mL) con 15 días de incubación	26
Figura 14. Matraces con 750 mL de medio de cultivo mixotrófico inoculados con <i>N. oleoabundans</i>	27
Figura 15. Curvas de crecimiento celular con el modelo matemático de Gompertz de <i>N. oleoabundans</i> en medios de cultivo mixotróficos (750 mL) por 15 días.	28, 29

Figura 16. Se puede observar la diferencia de coloración en los extractos obtenidos de <i>Neochloris oleoabundans</i> sometida a diferentes tratamientos mixotróficos.	31
Figura 17. Células de <i>Neochloris oleoabundans</i> en condiciones control observadas en la cámara de Neubauer con el objetivo 40x.	39
Figura 18. Imágenes tomadas durante el proceso de liofilización y extracción de lípidos	40

NOMENCLATURA

°C	Grados Celsius
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
µmol	Micromoles
ALA	Ácido α-linolénico
DE	Peso del extracto seco
DHA	Ácido docosahexaenoico
DW	Peso de la biomasa seca
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EPS	Exopolisacárido
FA	Ácidos grasos
FAP	Ácidos grasos poliinsaturados
FAS	Síntesis de ácidos grasos
g	Gramos
GC	Cromatografía de gases
h	Horas
L	Litros
LED	Diodo emisor de luz
m	Metros
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
pH	Potencial de hidrógeno
psi	Libra por pulgada cuadrada
R	Rendimiento

rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
SEM	Microscopia electrónica de barrido
TCA	Ciclo del ácido tricarboxílico
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TGA	Triglicéridos o triacilglicerol
v	Volumen

RESUMEN

Nombre: Ana Patricia Garza Chapa
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: Comparación en la producción de biopolímeros de alta densidad y lípidos intracelulares a partir de la microalga *Neochloris oleoabundans*.

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada.

Área de estudio: Biotecnología y Microbiología

Número de páginas: 61

Propósito y Método de estudio: Los microorganismos fotosintéticos como las microalgas, se han catalogado como una de las fuentes más prometedoras para la producción de biomoléculas de alto valor; donde los ácidos grasos (FA) y exopolisacáridos (EPS) presentan aplicación en la elaboración de tratamientos profilácticos para enfermedades cardiovasculares y crónico degenerativas o como excipientes, biosurfactantes y bioemulsificantes, respectivamente. *N. oleoabundans* es una microalga verde clorofita halotolerante que puede utilizar medios mixotróficos para su crecimiento y, potencialmente, para la producción de dichas biomoléculas de alto valor. En este proyecto se busca cultivar *N. oleoabundans* en diferentes medios mixotróficos con la finalidad de comparar la producción simultánea de FA y EPS.

Contribuciones y Conclusiones: En este estudio se realizaron medios de cultivo mixotróficos de agua dulce como pruebas preliminares, en los cuales se añadió NaCl y glucosa o lactosa como fuentes de carbono orgánico. Se observó que los cultivos mixotróficos con glucosa a 5 y 10 g/L, tanto de agua dulce como de agua salada a 9 g/L, obtuvieron una mayor producción de biomasa que los medios con lactosa a 5 y 10 g/L. Sin embargo, al obtener el extracto seco lipídico se observó que los medios de cultivo mixotróficos con lactosa (DL5, DL10, S9L5 y S9L10) presentaron un mayor porcentaje de rendimiento, mientras que los cultivos mixotróficos con glucosa (DG5, DG10, S9G5 y S9G10) obtuvieron un valor menor, incluso menos que el medio de cultivo control. Estos datos preliminares nos proporcionan información para futuras investigaciones.

Asesor: Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredó

ABSTRACT

Purpose and Study Method: Photosynthetic microorganisms such as microalgae, have been listed as one of the most promising sources for the production of high-value biomolecules; where fatty acids (FA) and exopolysaccharides (EPS) have application in the development of prophylactic treatments for cardiovascular and chronic degenerative diseases, or as excipients, biosurfactants and bioemulsifiers, respectively. *N. oleoabundans* is a halotolerant chlorophyte green microalgae that can use mixotrophic conditions for its growth and, potentially, be a source for the production of various high value biomolecules. This project seeks to cultivate *N. oleoabundans* in different mixotrophic cultures with the purpose of comparing the simultaneous production of FA and EPS.

Contributions and Conclusions: In this study, fresh water mixotrophic culture media are used as preliminary tests, where NaCl are added for salt water, and glucose or lactose are used as sources of organic carbon. Mixotrophic cultures were analyzed with glucose at 5 and 10 g/L, both fresh water and salt water at 9 g/L, obtained a higher biomass production than the media with lactose at 5 and 10 g/L. However, when obtaining the lipidic dry extract, it was found that the lactose mixotrophic culture media (DL5, DL10, S9L5 and S9L10) presented a higher yield percentage, while the glucose mixotrophic cultures (DG5, DG10, S9G5 and S9G10) obtained a minor values, even less than the culture control medium. These preliminary data provide us information to future investigations.

CAPÍTULO 01

INTRODUCCIÓN

Las microalgas son organismos fotosintéticos que se encuentran comúnmente en hábitats acuáticos, tanto de agua dulce como de agua salada¹. Estos organismos unicelulares eucarióticos se han propuesto para sustituir a las plantas terrestres en la producción de diferentes biomoléculas de alto valor industrial debido a que su crecimiento suele ser más rápido y su productividad por área es mayor².

Se pueden cultivar de forma sustentable en diferentes tipos de bioreactores, abiertos o cerrados, en cualquier estación del año, utilizando condiciones y medios de cultivo especializados o incluso aguas residuales para su crecimiento, presentando diferentes alternativas para disminuir los costos de producción y el gasto energético³.

Dependiendo de las condiciones y nutrientes donde se desarrollan, las microalgas pueden producir diferentes moléculas o nutrientes de importancia industrial como vitaminas, pigmentos, proteínas, carbohidratos, lípidos, entre otros⁴, que tienen aplicaciones potenciales en formulaciones de alimentos, nutrición, cosméticos, farmacéuticos, fertilizantes o tratamiento de aguas residuales (Tabla 1).

Tabla 1. Productos a partir de microalgas de alto valor industrial⁵.

Biomoléculas	Productos	Usos
Carbohidratos	Celulosa	Bioetanol
	Endopolisacáridos	Nutrición humana
	Exopolisacáridos	Nutraceuticos/Farmacéuticos
	β -glucanos	
Proteínas	Aminoácidos	Alimentos para humanos/ animales
	Péptidos bioactivos	Nutraceuticos/Farmacéuticos
Lípidos	Triglicéridos	Biodiesel
	Hidrocarburos	Nutraceuticos
	Ácidos grasos	
Pigmentos	Clorofilas	Cosméticos
	Carotenoides	Tecnología de alimentos
	Ficobilinas	Nutrición humana Nutraceuticos/Farmacéuticos
Otras biomoléculas activas	Antivirales	Farmacéuticos
	Antibacteriales	
	Antiprotazoarios	
	Antifúngicos	

La producción de bioetanol a partir de carbohidratos como la celulosa, hemicelulosa o el almidón presente en las células de las microalgas fue uno de los primeros enfoques de investigación, sin embargo, a pesar de los avances el costo de los tratamientos y de la producción continúa siendo un factor limitante. Las microalgas también presentan β -glucanos en la pared celular, los cuales son de amplio interés por sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antiosteoporóticas, antialérgicas e inmunomoduladoras⁶.

Otras de las biomoléculas con mucho interés en las investigaciones con microalgas son los pigmentos. Las propiedades antioxidantes en estas moléculas son utilizadas principalmente en industrias farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas⁵. Las clorofilas presentes en estos microorganismos suelen utilizarse como colorantes en industrias de alimentos. Se ha reportado que los compuestos derivados de las clorofilas como la feofitina, clorofilina o feoforbida presentan propiedades anticancerígenas, especialmente en el tracto digestivo⁷. En el caso de los carotenoides, carotenos o xantofilas, son ampliamente utilizados como antioxidantes y colorantes. Un ejemplo es el β -caroteno, comúnmente conocido por sus propiedades profilácticas en padecimientos relacionados con la vista, además de presentar aplicaciones terapéuticas en enfermedades de la piel, artritis, cardiovasculares, anticancerígenas y también en formulaciones con propiedades anti-edad⁸.

Los exopolisacáridos producidos por algunas microalgas verdes, como *C. vulgaris*, *D. salina* y *T. tetrahele*, por mencionar algunas, han presentado bioactividad como moléculas antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antibacteriales y con propiedades para prevenir enfermedades infecciosas^{9,10,11}. También se han propuesto como biosurfactantes y bioemulsificantes con utilidad en la industria, así como bioabsorbentes para la remoción de contaminantes como los metales en el tratamiento de aguas residuales¹².

La producción de lípidos en las microalgas presenta dos principales usos potenciales: elaboración de biodiesel y fuente de ácidos grasos omega-3 requeridos en la dieta. Las características de la microalga, las condiciones de cultivo, los nutrientes en el medio y otros factores son críticos en el perfil de ácidos grasos que se puede obtener de estos microorganismos¹.

Según el reporte en Credence research (2018), el segmento industrial perteneciente a nutraceuticos y suplementos alimenticios representaron más del 70% del mercado global en 2018, por lo que los productos obtenidos de las microalgas para estos fines presentan una atractiva opción de comercio en los próximos años. Actualmente ya se encuentran productos de microalgas en el mercado, los cuales fueron valorados en \$33.9 billones de dólares en 2018 y se espera que alcance hasta los \$56.5 billones de dólares para el 2027, con la expansión de una tasa compuesta anual del 6%¹³.

En este proyecto se busca aprovechar las características metabólicas de la microalga verde *Neochloris oleoabundans* para comparar la producción de lípidos intracelulares y exopolisacáridos en cultivos mixotróficos de agua dulce y agua salada con dos variantes en la fuente orgánica del carbono: glucosa y lactosa. Los medios mixotróficos que serán utilizados tendrán variación en su composición, principalmente en el cloruro de sodio que será agregado en el medio salino y a la par, se observará el crecimiento celular de la microalga en presencia de un monosacárido y un disacárido como fuente de carbono. Esto con la finalidad de determinar bajo cuál de estas condiciones la microalga *Neochloris oleoabundans* produce en mayor cantidad ácidos grasos y exopolisacáridos de posible interés industrial, y de esta forma, proporcionar una base para su producción de manera sustentable en plantas piloto o semipiloto.

CAPÍTULO 02

ANTECEDENTES

2.1 *Neochloris oleoabundans*

Neochloris oleoabundans es una microalga verde clorofita de forma ovoide con un tamaño variable, aproximadamente de 6 μm a 25 μm . Se reproduce asexualmente por medio de zoosporas y aplanosporas formadas por biparticiones sucesivas. Fue descubierta por primera vez en los desiertos de dunas en Arabia Saudita y publicada en el año de 1962 por Chantanachat & Bold¹⁴. Posteriormente, se registró el sinónimo de esta microalga con el nombre de *Ettlia oleoabundans* por Komárek en 1989¹⁵ (Tabla 2). *N. oleoabundans* habita normalmente en aguas dulces, sin embargo, se ha reportado que tiene la capacidad de crecer en medios salinos, siendo una microalga halotolerante.

Tabla 2. Taxonomía de *Neochloris oleoabundans* y *Ettlia oleoabundans*.

	<i>Neochloris oleoabundans</i> ¹⁶	<i>Ettlia oleoabundans</i> ¹⁷
Dominio	Eukaryota	Eukaryota
Reino	Plantae	Plantae
Subreino	Viridiplantae	Viridiplantae
Infrareino	Chlorophyta	Chlorophyta
Filo	Chlorophyta	Chlorophyta
Subfilo	Chlorophytina	Chlorophytina
Clase	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales	Chlamydomonadales
Familia	Neochloridaceae	Chlamydomonadales incertae sedis
Género	<i>Neochloris</i>	<i>Ettlia</i>

Los organismos unicelulares pertenecientes al filo clorofita pueden agruparse en tres diferentes grupos taxonómicos según la estructura y composición de la pared celular, donde *N. oleoabundans* se podría clasificar en el grupo dos, el cual menciona que dicha pared celular está compuesta por polisacáridos comunes en las plantas como los mananos, glucanos, arabinogalactanos, algalanos y algunos otros polisacáridos¹⁸.

En una investigación publicada en el 2018 por Rashidi &Trindade se reportó la naturaleza bioquímica y estructural de la pared celular de *N. oleoabundans* cultivada en medio de agua dulce, la cual está conformada principalmente por proteínas (31.5%), seguido por polisacáridos (24.3%), lípidos (22.2%), materia inorgánica (8.8%) y otros compuestos (14%) en relación con el peso seco de la biomasa¹⁹.

La estructura de la pared celular vista en imágenes tomadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM) se observó que la pared celular de *N. oleoabundans* está compuesta por una capa exterior delgada pero más densa electrónicamente y una interior menos densa. En la capa exterior se logró observar un revestimiento de pequeñas estructuras parecidas a los pilis (Figura 1). También se reveló en este estudio que las células hijas presentan la capa exterior más ondulada y de un aspecto “suelto”, mientras que en las células progenitoras se observan menos onduladas y más estiradas¹⁹.

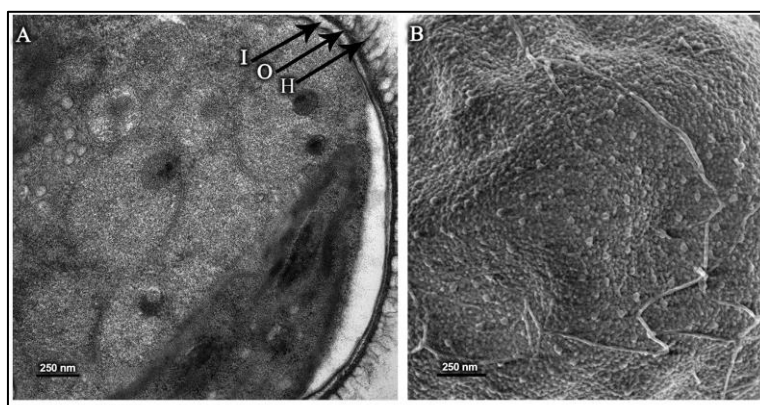


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido y transmisión respectivamente de las células de *N. Oleoabundans* tomadas por Rashidi y Trindade. En la figura A se puede observar las dos capas de la pared celular con las estructuras parecidas a los pilis, en B se puede observar la superficie de la pared celular con las estructuras parecidas a los pilis.

Las microalgas a pesar de ser organismos fotoautótrofos requieren de diferentes nutrientes en el medio de cultivo para la obtención de energía, crecimiento y reproducción celular. Los nutrientes que influyen de manera significativa en estos procesos son el

carbono, el nitrógeno y el fósforo, seguido de otros microelementos como el potasio, azufre, hierro, magnesio, calcio, vitaminas, entre otros.

El carbono se considera el principal nutriente en estos microorganismos, ya que es el elemento más abundante en la biomasa, constituyendo hasta un 65% en relación de su peso seco. Además, es un elemento indispensable para generar energía en forma de CO₂, debido a que es el compuesto principal en la fijación del carbono dentro del ciclo de Calvin durante la fotosíntesis. Sin embargo, hay ciertos microorganismos que también pueden utilizar el carbono orgánico como fuente de energía, principalmente de monosacáridos como la glucosa, del ácido acético, el glicerol y la urea. A este tipo de microorganismos se les conoce como mixotróficos y pueden presentar algunas ventajas sobre los organismos autotróficos o heterotróficos, como el aumento en la velocidad de crecimiento y por lo tanto en la producción de biomasa²⁰. *Neochloris oleoabundans* es una microalga con estas características, lo que permite tener más opciones en el manejo de sus cultivos para la obtención de biomasa y productos de alto valor.

2.2 Lípidos

Los lípidos son moléculas diversas en estructura que se pueden encontrar en todas las células eucariotas y procariotas, las cuales son clasificadas principalmente por su naturaleza no polar. Existen diferentes tipos de lípidos, tales como las ceras, triglicéridos, fosfolípidos, terpenos, vitaminas, esteroides y ácidos grasos, por mencionar algunos. Estas biomoléculas representan una parte fundamental de la vida al estar relacionadas en la formación de estructuras importantes a nivel celular o en vías metabólicas de gran importancia.

Las microalgas verdes se han convertido en una fuente prometedora de producción y obtención de diversas biomoléculas lipídicas con usos potenciales en la industria. Entre los lípidos que contienen las microalgas se encuentran los de naturaleza polar como los fosfolípidos y los glicolípidos que constituyen parte de la membrana celular, y los de naturaleza neutra o no polar como los triglicéridos y los ácidos grasos que son producidos y almacenados por la célula como nutrientes de reserva.

Estos microorganismos fotosintéticos suelen producir naturalmente hasta un 20%-40% de lípidos en relación con su peso seco, los cuales son almacenados dentro de cuerpos lipídicos en la célula²¹. Sin embargo, se ha documentado que suelen aumentar la producción de estas moléculas cuando la microalga se encuentra bajo condiciones de estrés, como la depleción de nutrientes, cambios en el pH del medio, alta salinidad, variación en la temperatura, exposición de la luz, etc. produciendo hasta un 80% de lípidos intracelulares²².

Neochloris oleoabundans es conocida por su capacidad de producir lípidos, por lo que se ha investigado ampliamente para la producción de éstos, sobre todo en condiciones de estrés. Es bien conocido que los lípidos son sintetizados en las microalgas dentro de los cloroplastos, pero no se ha determinado específicamente la ruta de síntesis de lípidos en esta microalga verde.

En un estudio realizado por de Jaeger *et al.* se describen las posibles vías metabólicas en las que *N. oleoabundans* produce estas biomoléculas a partir del acetil-CoA, que es sintetizado en la glucólisis o en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). El acetil-CoA proveniente de la glucólisis puede continuar la síntesis de ácidos grasos (FAS) por su conversión a malonyl-CoA y malonyl-ACP, que continúan al ciclo de FAS por medio del acil-ACP, mientras que el acetil-CoA proveniente del ciclo de TCA se convierte en 3-cetoacil-ACP y posteriormente entra en el ciclo de FAS.

Por otro lado, se cree que la microalga *N. oleoabundans* bajo situaciones de estrés como la depleción de nutrientes puede sintetizar lípidos por medio del gliceraldehído 3-fosfato proveniente de la glucólisis y de la ruta metabólica de las pentosas fosfato (PPP), que posteriormente al convertirse en acil-CoA entra al ciclo de FAS²³. Los lípidos sintetizados como los TAGs, además de ser almacenados en las microalgas en forma de cuerpos lipídicos en el citoplasma, se pueden encontrar dentro del espacio inter-tilacoidal en algunas especies de microalgas verdes.

Debido a los aumentos en la producción de lípidos en situaciones de estrés en las microalgas, se han buscado diferentes formulaciones de medios de cultivo, condiciones de incubación y consorcios de microorganismos para inducir una mayor síntesis de estos.

Como se ha comentado con anterioridad, *Neochloris oleoabundans* es una microalga versátil e interesante para probar en diferentes ambientes de crecimiento, ya que se ha demostrado que puede aprovechar las fuentes de carbono orgánico para su crecimiento, además de desarrollarse en medios de cultivo dulces y salinos.

En un estudio realizado por Baldisseroto *et al.* en el 2016 cultivó a *Neochloris oleoabundans* en medios mixotróficos con glucosa y desechos de manzana para comparar la producción de lípidos de interés en la elaboración de biocombustibles. En dicho experimento, se observó que el crecimiento de la microalga fue promovido por las condiciones del cultivo mixotrófico con glucosa, además que se obtuvo un rendimiento de hasta 27.06% DW de lípidos totales en este medio de cultivo, de los cuales los lípidos neutros como el TAG constituían la mayor proporción con un 20.55% DW²⁴.

Silva y colaboradores llevaron a cabo un diseño de experimentos Box-Behnken con la finalidad de obtener la información necesaria para cosechar una mayor cantidad de biomasa con alto índice de proteínas y contenido lipídico, utilizando un cultivo mixotrófico con glucosa y acetato de sodio en biorreactores. Se obtuvo hasta un 34.7% DW de lípidos totales y 11.25% DW que representa a ácidos grasos libres²⁵.

Pero no solo es importante el rendimiento de los lípidos totales o de los ácidos grasos en general en la producción de aceites de origen microalgal, sino también de que tipo de FA contienen, es decir, no todos los ácidos grasos pueden utilizarse para un producto u otro. Por ejemplo, para la elaboración de biocombustibles como el biodiesel es importante tener como materia prima ácidos grasos saturados (FAS) o TAGs, mientras para el sector farmacéutico, nutracéutico o de alimentos se requieren ácidos grasos poliinsaturados (FAP) tales como el ácido alfa linolénico (ALA), EPA y DHA o comúnmente conocidos como “omega-3”. Por lo que la realización del perfil de ácidos grasos en la microalga *Neochloris oleoabundans* es de suma importancia para definir su aplicación.

Aunque la producción de lípidos y obtención de aceites de buena calidad resulta ser muy prometedora, se tiene una gran problemática: la producción de estos a gran escala con bajo costo. Esto es debido a que los procesos previos a la extracción como la liofilización o el secado de la biomasa y el procesamiento de la biomasa con métodos

mecánicos como la homogenización a alta presión o métodos como el uso de microondas y el ultrasonido con buenos rendimientos a gran escala conllevan un mayor gasto energético o un alto costo monetario debido al mantenimiento de estos equipos en una escala comercial²⁶. Además de los métodos de extracción con los métodos mecánicos, están los métodos enzimáticos o químicos. El uso de solventes orgánicos como el cloroformo para la extracción de lípidos a partir de las microalgas puede tener impacto en el medio ambiente¹. Por esta razón, en la actualidad se estudian diferentes métodos de producción, extracción y separación de lípidos de forma sustentable, ecológico, económicos y aplicables a gran escala.

2.2 Exopolisacáridos

Las microalgas verdes tienen la capacidad de producir biopolímeros de alto peso molecular, como los exopolisacáridos (EPS), con la finalidad de defenderse ante situaciones de peligro o estrés en el medio que los rodea, los cuales pueden recubrir la célula o pueden ser expulsados al medio extracelular (Figura 2). Los EPS producidos por los microorganismos varían en su estructura y composición molecular, pueden ser formados por un mismo tipo de azúcar “homopolisacáridos” o por diferentes tipos de azúcares “heteropolisacáridos”. Los azúcares que comúnmente forman los EPS son glucosa, galactosa, ramnosa, fucosa, arabinosa, xilosa, manosa, 3-O-metil glucosa y residuos de ácido galacturónico y ácido glucorónico²⁷.

Además de los azúcares, los EPS pueden tener en su estructura grupos sulfatos, fosfatos, entre otros que contribuyen a la naturaleza aniónica de los EPS, proporcionando las características “pegajosas” de estas moléculas, así como grupos hidrofóbicos y peptídicos que influyen en las propiedades emulsificantes de los EPS²⁸.

Las microalgas producen los EPS en el aparato de Golgi, en donde los azúcares simples son unidos por medio de diferentes tipos de enzimas glucosiltransferasas, formando enlaces glucosídicos entre sí hasta formar los polisacáridos, los cuales son formados, empaquetados y expulsados de la célula²⁹.

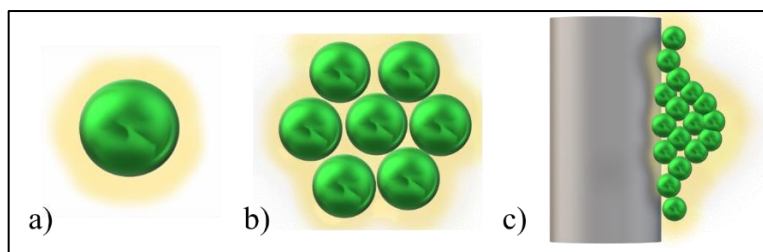


Figura 2. Representación de EPS en células de microalgas: a) EPS como revestimiento celular, b) EPS como agente agregante o floculante, c) EPS como adhesivo celular en superficies.

Se han reportado diferentes tipos de polisacáridos producidos por microalgas verdes, los cuales presentan diferentes aplicaciones dependiendo de su estructura molecular. Los polisacáridos con aplicaciones fermentativas no son comúnmente comercializados debido a la competencia que tienen contra los polisacáridos provenientes de macroalgas o plantas. Sin embargo, los EPS producidos por estos microorganismos fotosintéticos poseen características potenciales para su uso comercial como aditivos, espesantes o gomas, biofloculantes, bioabsorbantes o como condicionadores de suelo. Los polisacáridos con grupos sulfuros son de interés farmacéutico, debido a sus propiedades antioxidantes y por su actividad terapéutica⁵.

Se han realizado diferentes estudios sobre la producción de EPS en diferentes especies de microalgas y cianobacterias, entre ellas algunas microalgas verdes como *C. vulgaris*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlamydomonas sp.*, *Oocystis sp.*, *Chlorella sp.*, *B. braunii*, entre otras (Tabla 3). Sin embargo, solo se ha reportado una investigación de EPS producido por *Neochloris oleoabundans*.

Wu *et al.* en el 2011 realizó esta investigación con la microalga *N. oleoabundans* en donde se reportó por primera vez el EPS producido por este microorganismo. Los cultivos se llevaron a cabo en medios salinos mixotróficos con glucosa o lactosa como fuente orgánica de carbono y depleción de nitrógeno. El EPS producido presentó una apariencia viscosa en el medio, se extrajo y se obtuvieron 5 g/L de EPS y su peso molecular fue de 505 kDa, sin embargo, no se realizó alguna caracterización molecular de este³⁰.

Tabla 3. Composición molecular de exopolisacáridos aislados a partir de microalgas verdes. Tabla adaptada de Xiao y Zheng²⁸.

Microalga	Componentes del EPS	Referencias
<i>C. vulgaris</i>	Glucosa, xilosa y ácido glucorónico	Moore y Tischer ³¹
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Glucosa, arabinosa, ácido glucorónico y fructosa	Moore y Tischer ³¹
<i>Chlamydomonas sp.</i>	Glucosa, xilosa y fructosa	Moore y Tischer ³¹
<i>Oocystis sp.</i>	Galactosa, arabinosa, ácido glucorónico y fructosa	Moore y Tischer ³¹
<i>Chlorella sp.</i>	Glucosa, fructosa, arabinosa y ácido glucorónico	Yalcin <i>et al.</i> ³²
<i>B. braunii</i>	Glucosa, galactosa, fructosa, arabinosa, ramnosa y ácido glucorónico	Allard y Casadevall ³³ ; Weiss <i>et al.</i> ³⁴

CAPÍTULO 03

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La microalga *Neochloris oleoabundans* tendrá una mayor producción de exopolisacáridos y lípidos en un medio mixotrófico salino con lactosa en comparación con los medios de cultivo anteriormente reportados.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Realizar la comparación del crecimiento y la producción de exopolisacáridos y lípidos producidos por *Neochloris oleoabundans* en medios mixotróficos de agua salina o agua dulce con glucosa o lactosa como fuente de carbono orgánico.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Realizar un diseño de experimentos para determinar la concentración de las fuentes de carbono y del cloruro de sodio en la preparación de los medios mixotróficos a utilizar.
2. Cuantificar y comparar el crecimiento celular y la biomasa generada en los cultivos mixotróficos.
3. Extraer los exopolisacáridos del medio de cultivo y los lípidos intracelulares de *N. oleoabundans*.

3.3 Aportación científica

Esta investigación determinará qué condiciones mixotróficas favorecen la producción simultánea de exopolisacáridos y lípidos a partir de la microalga *Neochloris oleoabundans* y así abrir pauta a futuras investigaciones que puedan utilizar estas condiciones en plantas piloto y/o semipilotos.

CAPITULO 04

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Plan de trabajo general del proyecto de investigación

El plan de trabajo general de este proyecto de investigación consta de seis etapas (figura 3): 1) Preparación de las instalaciones con luz necesarias para la incubación de la microalga *Neochloris oleoabundans*, 2) serie de incubaciones en agar y líquido para la adaptación de la microalga al medio de cultivo a utilizar en el proyecto, 3) realizar un diseño de experimentos para detectar posibles interacciones entre los componentes del medio de cultivo base, la sal y las fuentes de carbono orgánico a utilizar en los diferentes medios de cultivo mixotróficos, 4) incubación de la microalga en los medios de cultivo mixotróficos elegidos y la medición de concentración celular, 5) extracción de los lípidos intracelulares con la adaptación del método clásico con solventes descrito por Bligh & Dyer³⁵ y de EPS por medio de precipitación con etanol a partir de la biomasa seca y el medio de cultivo respectivamente. Dichas etapas serán descritas en las secciones siguientes.

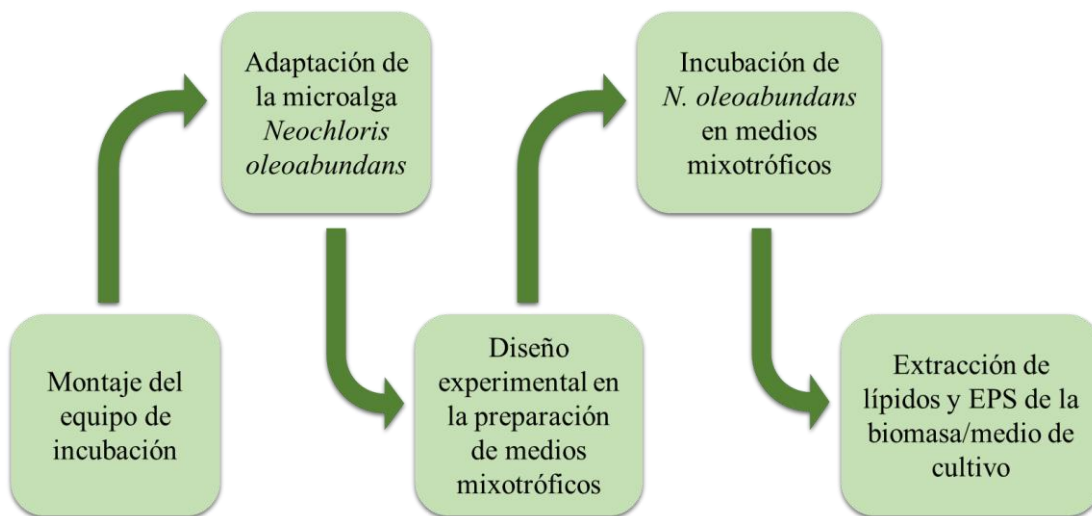


Figura 3. Esquema de las etapas generales del proyecto de investigación.

4.2 Disposición de residuos

Los residuos generados durante el proceso de este proyecto de investigación se dispusieron y clasificaron de acuerdo con sus características y a los reglamentos establecidos por la Facultad de Ciencias Químicas, UANL. El Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas se asegurará de llevar a cabo las labores pertinentes de almacenaje previo a la disposición final de los residuos de acuerdo con los procedimientos para la clasificación de estos siguiendo el formato PR-CLB-SRR/000.

4.3 Materiales

Matraz Erlenmeyer 50, 125, 250, 500, 1000 y 2000 mL de marca Pyrex, micropipetas de 2-20, 20-200 y 100-1000 μL marca BioPette, puntillas para micropipeta marca Eppendorf, pipetas serológicas desechables de 5 y 10 mL marca Thermo Scientific, tubos para centrífuga de 15 y 50 mL marca Corning, cajas Petri desechables estériles, filtros para jeringa de 0.2 μm de poro y 25 mm de diámetro estéril marca SUPOR, Cámara de Neubauer de 0.1 mm^3 de profundidad marca HAUSSER SCIENTIFIC, parafilm marca Bemis.

4.4 Reactivos

KNO_3 Marca DEQ, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ marca PQM, KH_2PO_4 marca JT Baker, HEPES marca Sigma-Aldrich, H_3BO_3 marca DEQ, EDTA-Fe (III)-Na marca Sigma-Aldrich, EDTA- Na_2 marca Sigma-Aldrich, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ marca JT Baker, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ marca Sigma-Aldrich, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ marca JT Baker, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ marca DEQ, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ marca DEQ, Vitamina B_{12} marca Sigma-Aldrich, D-Biotina marca Sigma-Aldrich, Tiamina-HCl marca Sigma-Aldrich, NaCl marca JT Baker, α -D-glucosa marca Sigma Aldrich, agar bacteriológico marca BD Bixon, lactosa anhidra marca DEQ, HCl marca JT Baker, NaOH marca DEQ, cloroformo marca JT Baker, metanol marca JT Baker, etanol absoluto 96% marca DEQ.

4.5 Equipos

Campana de flujo laminar marca PRENDO, incubadora marca LabTech, medidor de luz quantum meter MQ200 marca Apogee, centrífuga Legend XF marca Thermo Scientific, vórtex marca VWR, Balanza analítica marca Sartorius Entris, Microscopio óptico marca Carl Zeiss, Potenciómetro marca HANNA, autoclave marca ALL AMERICA-USA, liofilizadora marca LABCONCO, baño de ultrasonido marca VWR, centrífuga con evaporador Benchtop marca GeneVac.

4.6 Realización del Proyecto

Este proyecto fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico dentro del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN) de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL, ubicado en el Parque de Investigación e Innovación Tecnológica (PIIT) en Apodaca, Nuevo León. También se realizaron experimentos en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo de Proteínas (CIDPRO) y el Centro de Biotecnología FEMSA ubicados en el Tecnológico de Monterrey (ITESM) campus Monterrey, Nuevo León.

4.7 Montaje de las instalaciones para la incubación.

Se armaron dos diferentes instalaciones de incubación para la microalga *Neochloris oleoabundans*. El primero constó en colocar una tira de luz LED cálido suave alrededor del soporte de la incubadora LabTech para la incubación de los matraces de 50, 125, 250, 500 y 1000 mL (figura 4). La segunda instalación fue montada en una mesa de trabajo, en este caso se colocó una lámpara de luz LED blanca para conservar los cultivos de la microalga en medio sólido. En ambos diseños de los equipos de incubación el flujo de fotones se encontraba dentro de un rango de 45-60 $\mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Figura 4. Montaje del sistema de luz LED en la incubadora LabTech para el crecimiento de la microalga verde.

4.8 Preparación de medio de cultivo.

El medio de cultivo base de agua dulce que se utilizó en este proyecto consta de los reactivos y cantidades descritos en la tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio de cultivo base de agua dulce descrito por Salim *et al*³⁶.

Nutriente	Concentración	Nutriente	Concentración
Componentes A:		Componentes B:	
KNO ₃	3 g/L	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.4 g/L
NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	0.26 g/L	CaCl ₂ •2H ₂ O	13 mg/L
KH ₂ PO ₄	0.74 g/L	Vitamina B ₁₂	1 µg/L
HEPES	2.38 g/L	D-Biotina	1 µg/L
H ₃ BO ₃	61.8 µg/L	Tiamina-HCl	200 µg/L
EDTA-Fe (III)-Na	0.11 g/L		
EDTA-Na ₂	37 mg/L		
ZnSO ₄ •7H ₂ O	3.2 mg/L		
MnCl ₂ •4H ₂ O	13 mg/L		
CuSO ₄ •5H ₂ O	1.83 mg/L		

Los medios de cultivo se realizaron de la siguiente manera: se prepararon soluciones con las concentraciones adecuadas de los componentes A descritos en la tabla 4, posteriormente se colocan en un matraz Erlenmeyer y se diluyen con agua bidestilada

hasta obtener el volumen deseado. Después se ajustó el pH a 6.8 con HCl 1M o NaOH 1M y se llevó a esterilizar por autoclave a 121°C y 15 psi por 15 min. Se retiró de la autoclave y se dejó enfriar para colocar por medio de filtro de jeringa los componentes B en la campana de flujo laminar, los cuales fueron previamente preparados en solución (figura 5). Para realizar este medio de cultivo en sólido se añadió 15 g/L de agar bacteriológico a la solución con los componentes A previamente a la esterilización por autoclave.

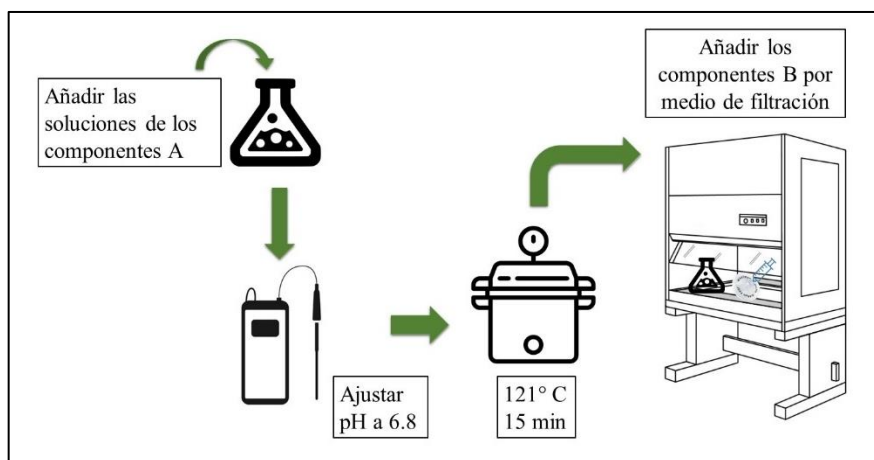


Figura 5. Esquema de preparación de medio de cultivo base de agua dulce.

4.9 Adaptación de la microalga *Neochloris oleoabundans*

La microalga *Neochloris oleoabundans* que se utilizó en este proyecto fue adquirida del centro de colección de cultivos de microalgas de la Universidad de Texas, EUA, con el número de cepa UTEX 1185. Se procedió a adaptar la cepa al medio de cultivo base utilizado en este proyecto, tanto en sólido como en líquido. En el caso del medio de cultivo líquido se comenzó la adaptación en 15 mL, posteriormente en 30, 50, 100 y 250 mL. Los cultivos se incubaron a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 150 rpm y $45\text{-}60 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 30 días (figura 6).

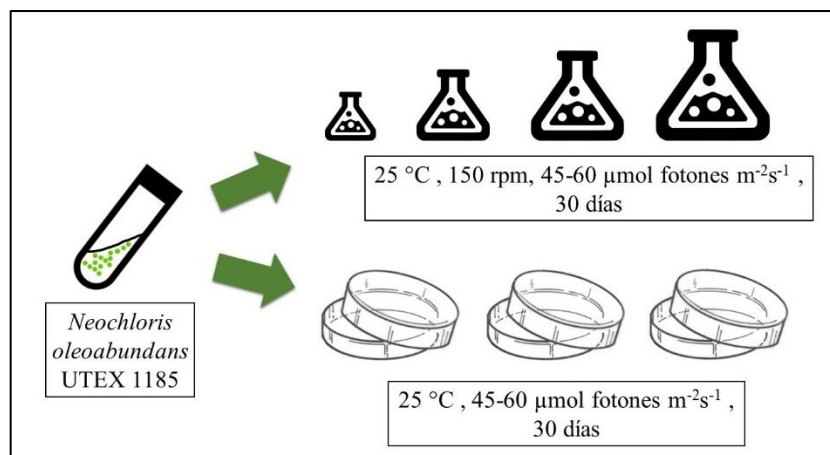


Figura 6. Esquema de adaptación de la microalga *Neochloris oleoabundans*.

4.10 Diseño experimental en la preparación de medios de cultivo mixotróficos.

Para preparar los medios de cultivo mixotróficos con NaCl, glucosa o lactosa, se procedió a realizar un diseño de experimentos exploratorio 2^k para descartar la posible formación de interferencias en el medio de cultivo, por lo que se llevaron a cabo en dos diseños experimentales con 2 factores y 3 niveles descritos en la tabla 5.

Tabla 5. Diseños experimentales exploratorios 2^k realizados en la preparación de medios de cultivo mixotróficos.

Diseño experimental	Factores/Niveles		
	NaCl (g/L)	Glucosa (g/L)	Lactosa (g/L)
1	0, 9, 27	5,10,15	0
2	0,9,27	0	5,10,15

La combinación de factores y niveles, así como la secuencia de la corrida de cada diseño experimental fue realizado por medio del software estadístico Minitab® 19 (figura 7). Los medios de cultivo fueron preparados con el medio base de agua dulce, en el cual el NaCl fue agregado en la solución de los componentes A previamente al ajuste del pH y esterilización por autoclave, mientras que las fuentes de carbono orgánicas fueron añadidas al medio de cultivo junto con los componentes B por medio del filtro de jeringa.

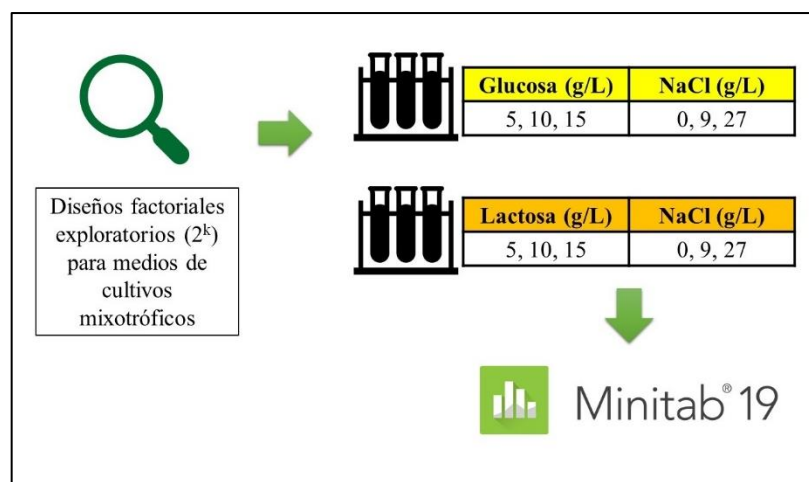


Figura 7. Esquema del diseño experimental 2^k en medios mixotróficos.

4.11 Incubación de *N. oleoabundans* en medios de cultivo mixotróficos y medición del crecimiento celular.

Se prepararon matraces con 100 y 750 mL de medios de cultivos mixotróficos de agua dulce o salina de 9 y 27 g/L, y glucosa o lactosa de 5 y 10 g/L, adquiriendo los siguientes medios: Control, DG5, DG10, S9G5, S9G10, S27G5, S27G10, DL5, DL10, S9L5, S9L10, S27L5 y S27L10 (D= dulce, S=salino, G=glucosa, L=lactosa). Posteriormente se inoculó con *N. oleoabundans* en cada medio de cultivo de modo que quedara una concentración inicial de 1×10^4 células/mL. Se colocaron en incubación a $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, 150 rpm y $45\text{-}60 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 15 días.

Para realizar las curvas del crecimiento celular se utilizó la cámara de Neubauer (profundidad 0.1 mm^3), contando las células bajo un microscopio óptico con el objetivo 40x (figura 8). Se contaron las células de la microalga presentes en los cuatro cuadrantes situados en los extremos de la cuadrícula de la cámara (Figura 9), calculando la concentración celular por medio de la ecuación 1.

$$[C] = \bar{x} \times FD \times V$$

Ecuación 1

Donde:

[C]:	Concentración celular (células/mL)	FD:	Factor de dilución
\bar{x} :	Promedio de células contadas por cuadrante	V:	Factor de volumen (10,000 mm ³) equivalente a 1 mL

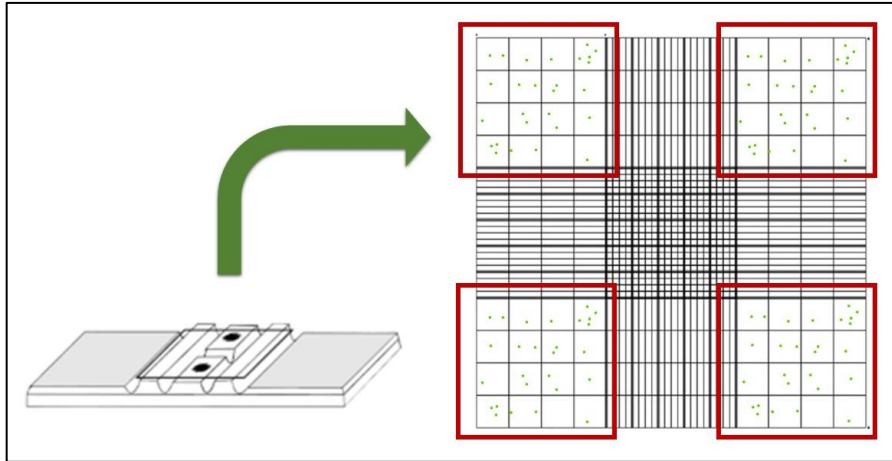


Figura 8. Representación de los cuadrantes contados en la cámara de Neubauer para determinar la concentración celular de *Neochloris oleoabundans*.

Para comparar las curvas de crecimiento celular entre los tratamientos mixotróficos se utilizó el modelo matemático corregido de Gompertz, el cual nos proporciona parámetros de la cinética de crecimiento como la tasa de velocidad máxima ($\mu_{\text{máx}}$), el tiempo de generación (G), fase de adaptación (λ) y el valor del crecimiento máximo (a). El modelo matemático corregido de Gompertz consiste en la ecuación 2. Las curvas de crecimiento se realizaron con ayuda del software Statistica 13 (TIBCO® Data Science).

$$Y = a \times \exp(-\exp(b - c \times T))$$

Ecuación 2

Donde:

Y:	$\text{Log}(N_{(T)}/N_0)$	T:	Tiempo (h)
$N_{(T)}$:	Número de células a cierto tiempo	b:	Constante
N_0:	Número de células inicial	c:	Constante
a:	Valor del crecimiento máximo		

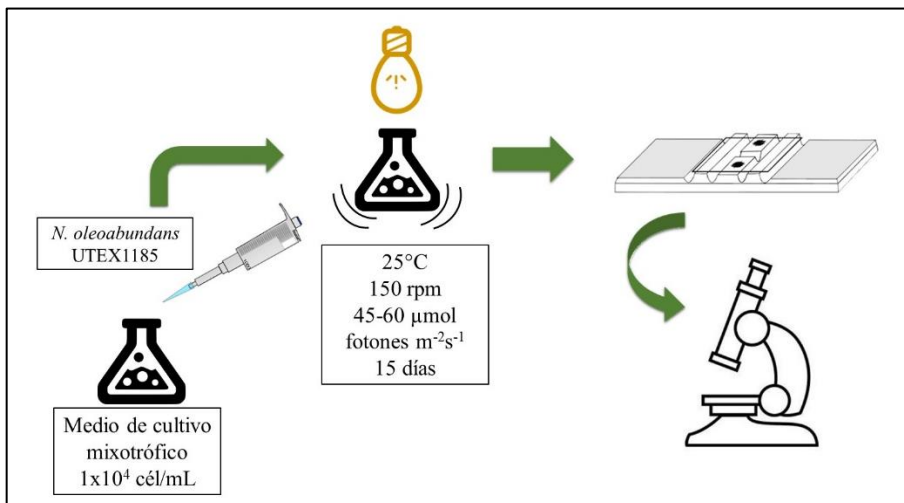


Figura 9. Esquema de inoculación y conteo celular de cultivos mixotróficos con *N. oleoabundans*.

4.12 Obtención de biomasa de los cultivos de *N. oleoabundans*.

Al finalizar el tiempo de incubación, se procedió a obtener la biomasa de los medios de cultivo mixotróficos utilizando una centrifuga a 2500 rpm, 4°C por 20 min. El sobrenadante se resguardó en refrigeración para la extracción de EPS y la biomasa en congelación a -18°C para la extracción de lípidos intracelulares (figura 10).

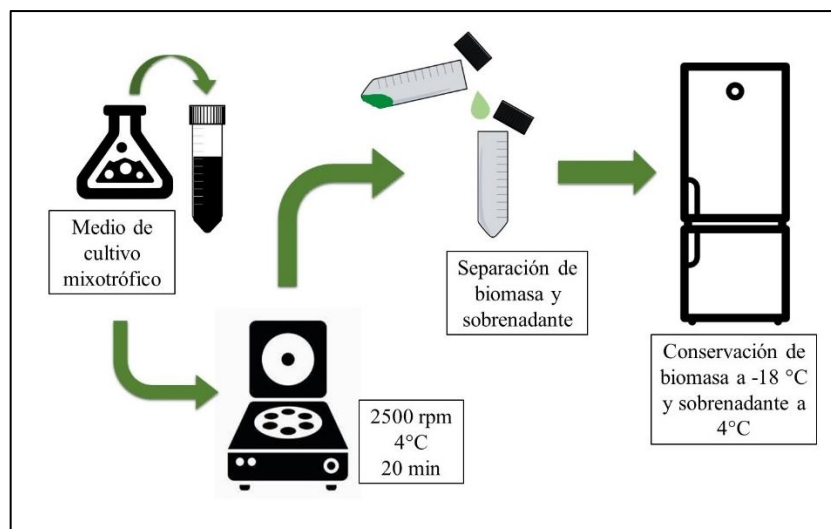


Figura 10. Esquema de obtención y conservación de biomasa y sobrenadante de los cultivos mixotróficos de *N. oleoabundans*.

4.13 Extracción de lípidos a partir de la biomasa de *N. oleoabundans*.

Para la extracción de los lípidos intracelulares de la microalga se colocó la biomasa en ultracongelación a -80°C para su posterior liofilización. Ya obtenida la biomasa seca, se trituró con una espátula para obtener un polvo más fino y se procedió a realizar la extracción mediante el método clásico con solventes orgánicos. Se añadió la mezcla de solventes compuesta por metanol:cloroformo:agua (relación 2:1:0.8 v/v) y se agitó por 1 min en vórtex, posteriormente se colocó en baño de ultrasonido a 35 kHz por 35 min, se centrifugó a 3000 rpm por 5 min y se pasó por papel filtro para eliminar restos celulares. Al filtrado se le añadió una parte de cloroformo y otra parte de solución salina al 0.9% para la formación del sistema bifásico, se agitó y se dejó reposar durante la noche. Finalmente se recuperó la fase inferior clorofórmica, se llevó a sequedad por medio de un evaporador al vacío con nitrógeno Benchtop (ciclo 1: very low BP, 35°C , 2 h; ciclo 2: low BP, 33°C , 2:35 h) y se obtuvo el rendimiento de la extracción utilizando la ecuación 3 (figura 11).

$$\%R = \frac{DE}{DW} \times 100$$

Ecuación 3.

Donde:

R: Rendimiento

DW: Biomasa seca

DE: Extracto seco

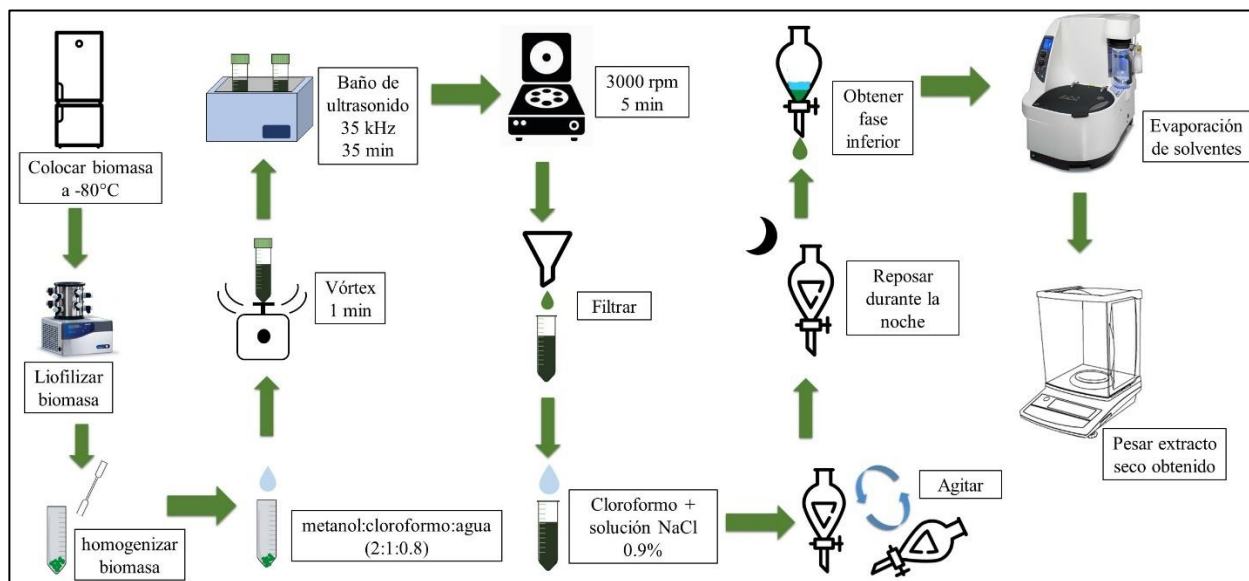


Figura 11. Esquema de extracción de lípidos intracelulares a partir de la biomasa de *Neochloris oleoabundans*.

4.14 Extracción de exopolisacáridos.

La extracción del EPS del medio de cultivo mixotrófico se realizó con un método simple, en el cual se mezcló una parte del sobrenadante refrigerado a 4°C del medio de cultivo con dos partes de etanol absoluto frío y se dejó reposar durante toda la noche a 4°C . Posteriormente se centrifugó a 4300 rpm, 4°C por 20 min para obtener el pellet del EPS. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resguarda el pellet del EPS en congelación a -18°C para su posterior liofilización (figura 12).

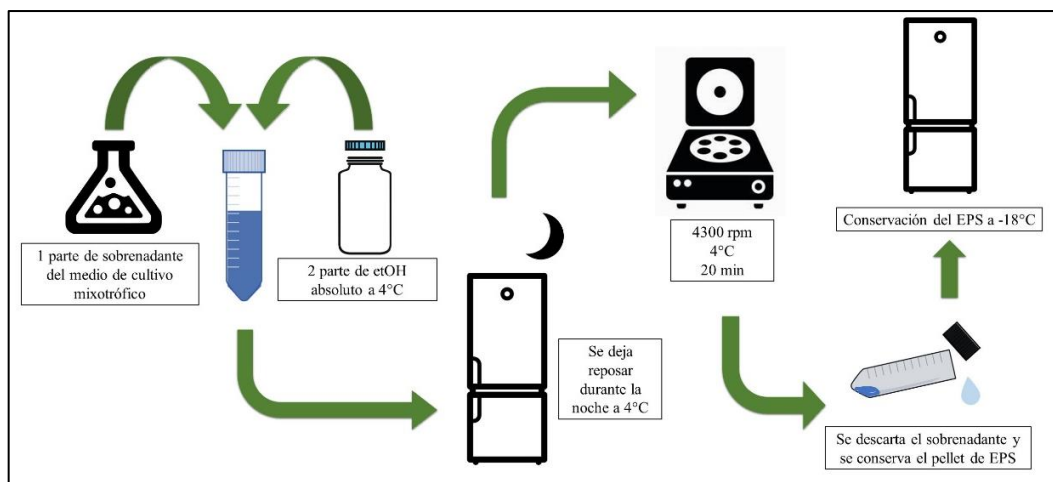


Figura 12. Procedimiento para la extracción de exopolisacáridos de los medios de cultivo mixotróficos.

CAPITULO 05

RESULTADOS

5.1 Diseño experimental exploratorio 2^k de cultivos mixotróficos

Se realizó el diseño experimental de acuerdo con la aleatorización descrita por el programa Minitab® 19. Se llevaron a cabo las corridas y se encontró que en ninguna combinación se presentó algún tipo de interferencia como precipitados, aglomeraciones o saturación de solutos en el medio; por lo que se descarta el análisis estadístico de los datos obtenidos. Con la información lanzada en este estudio, se eligieron 2 niveles de las fuentes de carbono orgánico (5 y 10 g/L) para la elaboración de los medios mixotróficos a utilizar en el proyecto.

5.2 Incubación de *Neochloris oleoabundans* en medios mixotróficos y crecimiento celular.

Inicialmente, se realizó la incubación de *Neochloris oleoabundans* durante 15 días en los medios de cultivo mixotróficos de 100 mL como pruebas preliminares, de los cuales los cultivos con 27 g/L de NaCl no presentaron crecimiento (S27G5, S27G10, S27L5, S27L10) y fueron descartados. Los cultivos que sí presentaron crecimiento continuaron con el proceso de obtención de biomasa (Figura 13). Posteriormente, se colocaron nuevamente en incubación los medios de cultivo mixotróficos que presentaron crecimiento en las pruebas preliminares anteriores en un volumen de 750 mL para realizar las curvas de crecimiento celular y análisis posteriores (control, DG10, S9G5 y S9G10). Las mediciones de la concentración celular se realizaron los días hábiles de la semana (lunes a viernes) durante 15 días, al finalizar los datos fueron registrados y se llevaron a cabo las curvas correspondientes con el modelo matemático de Gompertz.

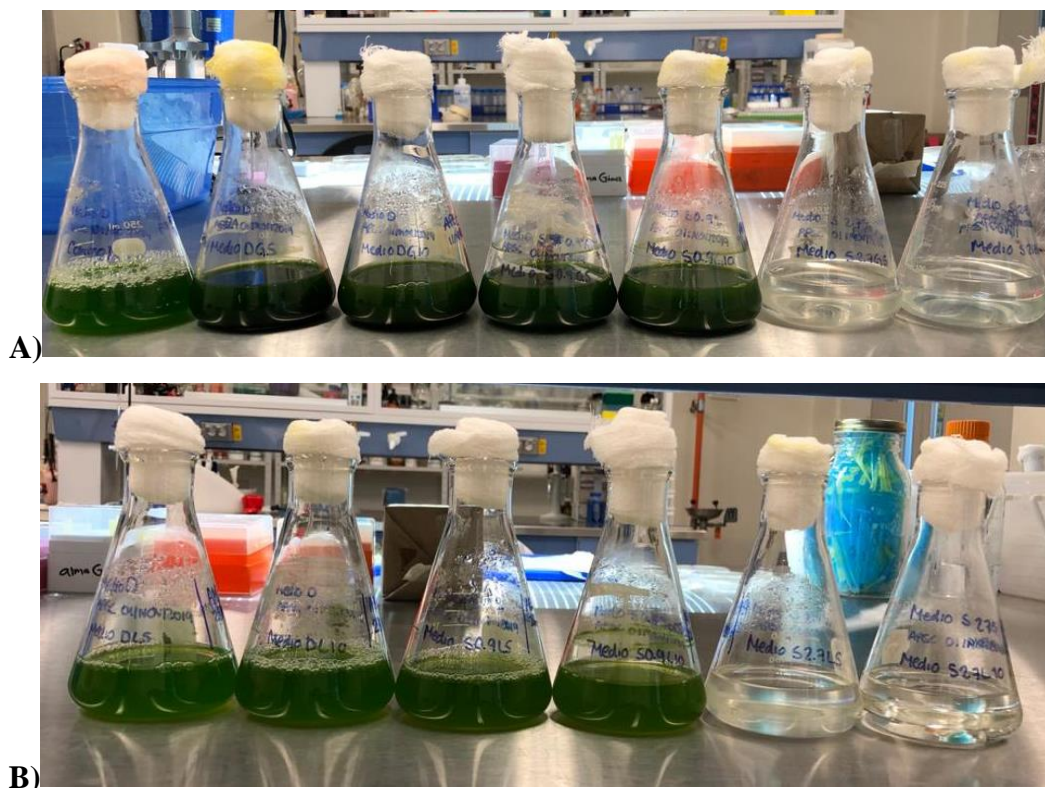


Figura 13. Crecimiento de *Neochloris oleoabundans* en medios mixotróficos preliminares (100 mL) con 15 días de incubación. A) Medios de cultivos mixotróficos dulces y salinos con glucosa, en orden de izquierda a derecha: control, DG5, DG10, S9G5, S9G10, S27G5 y S27G10, B) medios de cultivo mixotróficos dulces y salinos con lactosa, en orden de izquierda a derecha: DL5, DL10, S9L5, S9L10, S27L5 y S27L10.

El medio de cultivo DG10 presentó contaminación a los 5 días de incubación aproximadamente. Al finalizar los días de incubación, los matraces con los diferentes medios de cultivo presentaron diferencias en coloración (figura 14). Con los datos obtenidos del modelo de Gombertz (Tabla 6) se dedujo que los medios de cultivo mixotróficos salinos con glucosa (S9G5 y S9G10) tienen mayor población celular (a), se reproducen más rápido ($\mu_{\text{máx}}$) y su tiempo de generación (G) es menor en comparación del medio de cultivo control y DG10, sin embargo, la microalga tarda más tiempo en adaptarse al medio de cultivo con un periodo de latencia (λ) más extendido. Se puede observar este comportamiento en las curvas de crecimiento de la figura 15, donde se distinguen la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria de *Neochloris oleoabundans* en los diferentes medios. El medio de cultivo S9G5 presentó la mejor cinética de crecimiento celular.

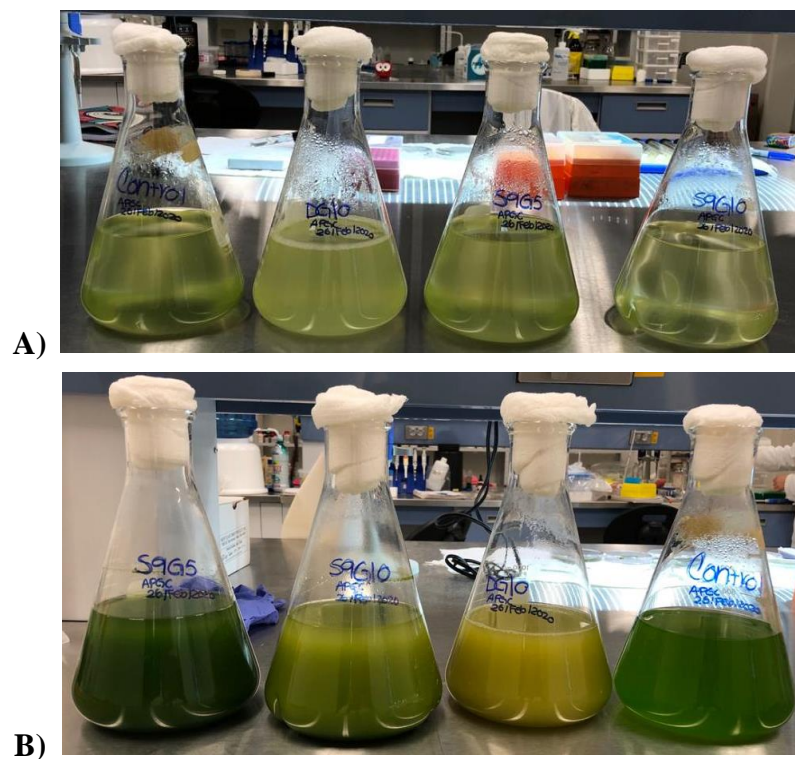
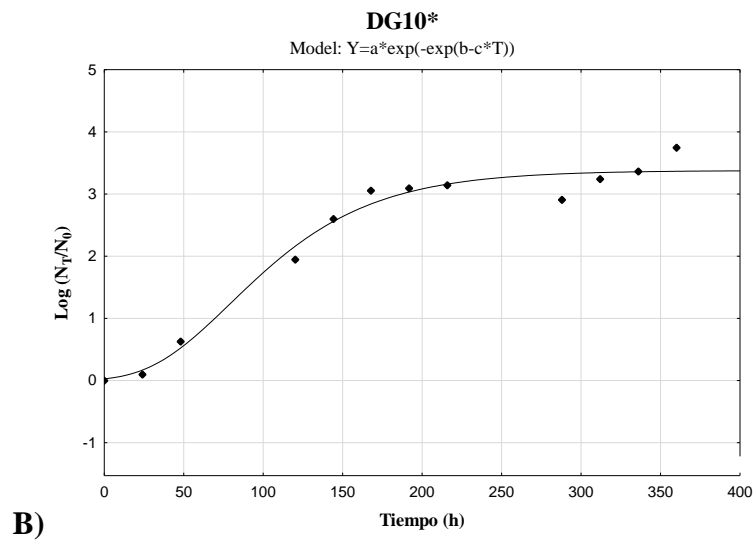
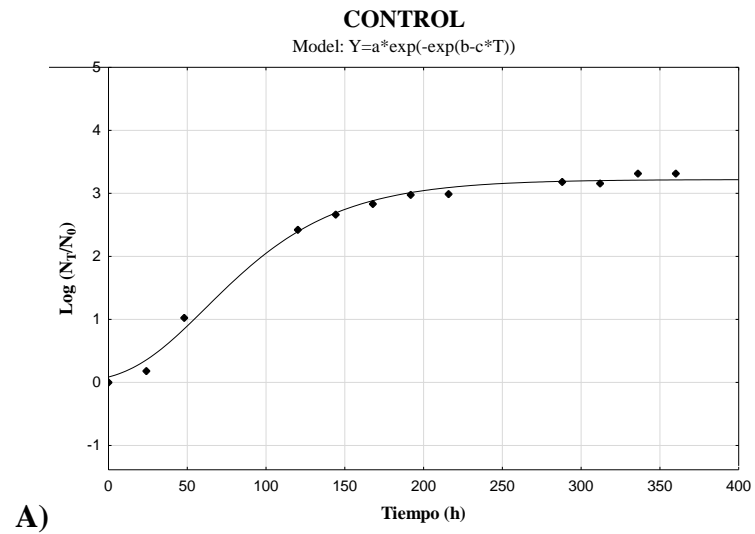


Figura 14. Matracas con 750 mL de medio de cultivo mixotrófico inoculados con *N. oleoabundans*: A) de izquierda a derecha: Control, DG10*, S9G5 y S9G10 a los 5 días de incubación, B) de izquierda a derecha: S9G5, S9G10, DG10* y Control a los 15 días de incubación. (*): Medio de cultivo con contaminación.

Tabla 6. Valores obtenidos de la cinética de crecimiento con el modelo matemático de Gompertz en los medios de cultivo mixotróficos. (*): Medio de cultivo con contaminación

Cultivo	a	b	c	$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$\lambda (\text{h})$	G (h)	R	R ²
Control	3.220	1.288	0.020	0.067	13.857	10.337	0.996	0.993
DG10*	3.378	1.576	0.019	0.066	29.083	10.356	0.988	0.977
S9G5	4.019	1.886	0.019	0.079	44.844	8.722	0.992	0.985
S9G10	4.408	2.067	0.017	0.076	61.748	9.097	0.971	0.944



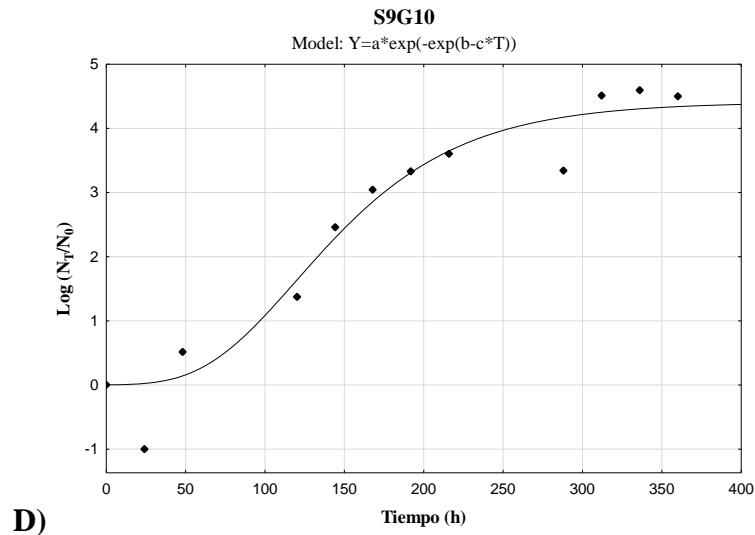
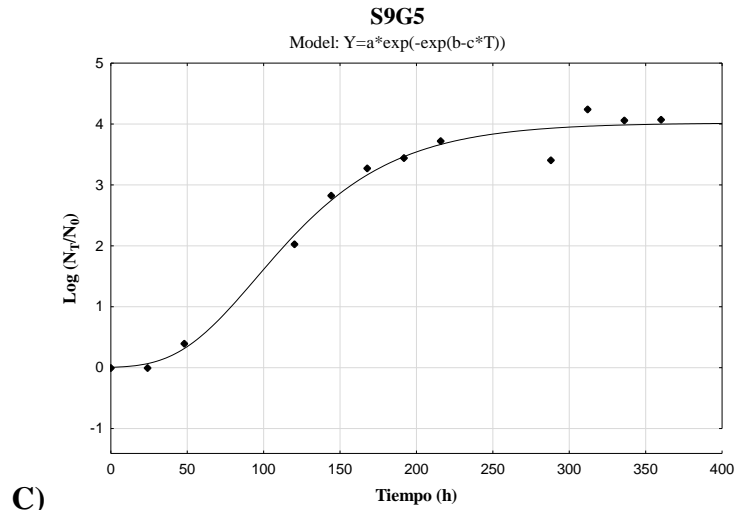


Figura 15. Curvas de crecimiento celular con el modelo matemático de Gompertz de *N. oleoabundans* en medios de cultivo mixotróficos (750 mL) por 15 días: A) Control, B) DG10*, C) S9G5, D) S9G10. La curva (-) corresponde al crecimiento celular estimado y los símbolos (♦) muestran los datos experimentales obtenidos. (*): Medio de cultivo con contaminación.

5.3 Obtención de biomasa.

La biomasa generada en los matraces con medios mixotróficos de 100 mL fue recolectada por medio de centrifugación, posteriormente se conservaron en congelación y fueron sometidos a liofilización durante 5 días. Al terminar la liofilización se registró la

biomasa seca obtenida por diferencia del peso húmedo (Tabla 7). Comparando la producción de biomasa entre el factor de NaCl añadido a los cultivos mixotróficos, se deduce que los cultivos salinos obtuvieron mayor cantidad de biomasa producida con relación a los medios de agua dulce, con una desviación estándar de hasta 307.73 del medio S9G5 vs el medio control. Por otro lado, si comparamos la cantidad de biomasa con relación en el factor de carbono orgánico añadido a los medios de cultivo mixotróficos, glucosa o lactosa, que los cultivos con glucosa obtuvieron mayor producción de biomasa que los medios de cultivo con lactosa.

Tabla 7. mg de Biomasa seca obtenida por liofilización de los medios de cultivo mixotróficos preliminares (100 mL).

DW: Peso seco de la biomasa, S: desviación estándar.

Cultivo	DW (mg)	S	Cultivo	DW (mg)	S
Control	185				
DG5	336.1	106.84	S9G5	620.2	307.73
DG10	448	185.97	S9G10	758.5	405.53
DL5	20	116.67	S9L5	280.1	67.25
DL10	227.8	30.26	S9L10	267.3	58.19

5.4 Extracción de lípidos intracelulares.

Posterior a la obtención de la biomasa seca, se procedió a realizar la extracción de lípidos intracelulares de los cultivos preliminares. La biomasa seca utilizada se pesó previamente a la extracción. La extracción se realizó conforme a la metodología descrita en la sección 4.13. Durante el proceso se observó la diferencia de tonalidad de los pigmentos en color verde entre los diferentes tratamientos mixotróficos (Figura 16). Al finalizar la extracción se registró el peso del extracto obtenido y se obtuvo el porcentaje de rendimiento del proceso conforme a la ecuación 3 (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento obtenido de la extracción de lípidos intracelulares de los medios de cultivo mixotróficos preliminares (100 mL). DW: Peso seco de biomasa, DE: Peso seco del extracto, R: rendimiento, S: desviación estándar. (*): Datos con probable error.

Cultivo	DW (mg)	DE (mg)	%R	S	Cultivo	DW (mg)	DE (mg)	%R	S
Control	62	51	82.26						
DG5	247	104	42.11	28.39	S9G5	266	99	37.22	31.85
DG10	378	3	0.79	57.61	S9G10	212	79	37.26	31.82
DL5	20	78	390*	217.61	S9L5	80	73	91.25	6.36
DL10	28	75	267.86*	131.24	S9L10	122	124	101.64*	13.70

En los porcentajes del rendimiento de la extracción lipídica de la tabla 8 se puede observar que en los medios de cultivo DL5, DL10 y S9L10 sobrepasan el 100%, lo que podría indicar un posible error técnico en el proceso como el pesado de las muestras, no se evaporaron con totalidad los solventes o que el extracto seco haya adquirido humedad durante su manejo, presentando un peso mayor a la biomasa seca. Los medios de cultivo con mayor porcentaje de rendimiento seguidos de los registros por encima del 100% son S9L5 y el medio control, presentando 91.25% y 82.26%, respectivamente. Esto nos indica que los medios de cultivo que presentaron los mejores rendimientos de la extracción lipídica son los medios que contienen la lactosa como medio de carbono orgánico, principalmente los de medio dulce.

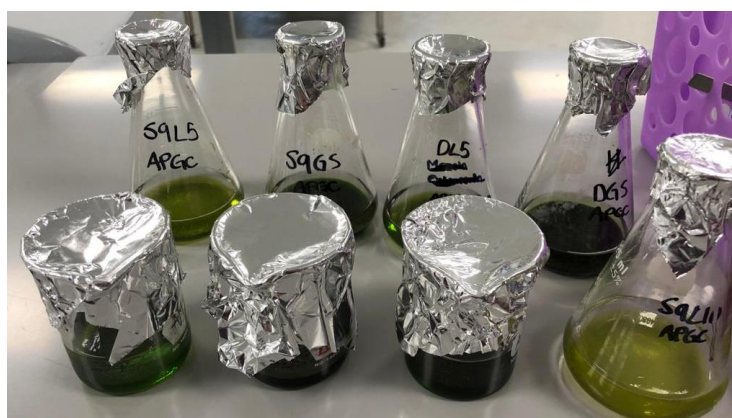


Figura 16. Se puede observar la diferencia de coloración en los extractos obtenidos de *Neochloris oleoabundans* sometida a diferentes tratamientos mixotróficos.

5.5 Extracción de exopolisacáridos.

Se realizó la extracción de los EPS a partir del sobrenadante de los medios de cultivo preliminares con etanol frío absoluto y se observaron pequeños precipitados en color crema de aspecto algodonoso, sin embargo, la cantidad obtenida no fue suficiente para continuar con los análisis posteriores, por lo que se tomó la decisión de descartarlos.

CAPÍTULO 06

DISCUSIÓN

6.1 Crecimiento celular y generación de biomasa en cultivos mixotróficos.

En las curvas de crecimiento celular y los valores matemáticos del modelo de Gompertz de los cultivos Control, DG10, S9G5 y S9G10 se observa que la fase exponencial comienza alrededor de las 14, 29, 45 y 62 horas posteriores al inicio de la incubación, respectivamente. La concentración máxima celular obtenida se encuentra entre las 288 a 336 horas que corresponden a los días 12 al 14 de la incubación, lo que indica que se encuentran dentro de la fase estacionaria en las curvas de crecimiento celular. En el estudio realizado por Baldisseroto en 2014, donde se cultivó a *Neochloris oleoabundans* en un medio salino al 17% con restos de manzana provenientes de una planta de producción de vinagre, se reportó un crecimiento casi al triple en relación con el medio de cultivo control. En dicha investigación señala que la fase estacionaria comienza a partir del día 7 de incubación y se mantiene hasta el día 21, fecha en que los cultivos son retirados³⁸. En las cinéticas de crecimiento celular de nuestra investigación, podemos observar que la fase estacionaria comienza a partir del día 7-8 de incubación, coincidiendo con lo reportado por Baldisseroto *et al.*, sin embargo, la diferencia en la concentración celular de los medios S9G5 Y S9G10 con el medio control si aumenta considerablemente pero no al mismo nivel que el autor, por lo que posiblemente se deba a la diferencia en la concentración de la salinidad y en la composición del producto de desecho de manzana en el medio de cultivo, el cual reporta que contiene aproximadamente 3% de azúcares totales: glucosa, fructosa y sucrosa.

La biomasa producida por los cultivos mixotróficos con glucosa es mayor al medio de cultivo control, tanto en agua dulce como en agua salada. Este comportamiento se ha reportado en otras investigaciones con *N. oleoabundans* y otras microalgas verdes, en diferentes medios de cultivo y concentraciones de glucosa³⁹ (tabla 9).

Tabla 9. Biomasa de diferentes microalgas verdes producidas en condiciones mixotróficas.

Microalga	Fuente de carbono	Medio de cultivo	Condiciones de cultivo	Rendimiento de biomasa en g/L	Referencias
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa al 1% v/v	Medio de cultivo Kuhl ⁴⁰ a pH 6.8	25°C ± 1, iluminación continua, flujo de aire y 10 días de incubación.	4.08	Mostafa <i>et al.</i> ⁴¹
<i>Spirulina platensis</i>	Glucosa 2 g/L por día	Medio de cultivo Zarrouk modificado a pH 9.5	25°C ± 1, iluminación continua, flujo de aire y 10 días de incubación	5.29	Li <i>et al.</i> ⁴²
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Glucosa al 1% v/v	Medio de cultivo Kuhl ⁴⁰ a pH 6.8	25°C ± 1, iluminación continua, flujo de aire y 10 días de incubación.	4.00	Mostafa <i>et al.</i> ⁴¹

Neochloris oleoabundans es una microalga que habita en el agua dulce, sin embargo, se ha reportado que puede crecer en condiciones salinas debido a la adaptación al ambiente extremo en donde fue encontrada y aislada por primera vez. En los cultivos mixotróficos con NaCl a 9 g/L se observó que la biomasa generada es mayor en relación con los cultivos con agua dulce. En el estudio realizado por Rashidi *et al.* sobre la composición de la pared celular de *N. oleoabundans*, se encontró que en la materia inorgánica de la pared celular contenía iones sulfato y sodio de forma predominante, por lo que se tiene la hipótesis que estos ayudan a la resistencia de la microalga a ambientes salinos, debido a que se han encontrado polisacáridos sulfatados en las paredes celulares de algunas microalgas que habitan en agua salada^{19,43,44}. A pesar de esto, no se presentó crecimiento en los cultivos con NaCl a 27 g/L, que es una concentración salina cercana a la contenida en el agua marina. Posiblemente la tasa de muerte celular de la microalga fue mayor a la tasa de crecimiento, por lo que no pudo avanzar de la fase de adaptación en la cinética de crecimiento.

Durante el crecimiento de la microalga en los diferentes medios de cultivo mixotróficos, se pudo observar a simple vista que los matraces de lactosa aparentemente contenían una cantidad de biomasa similar a los medios con glucosa (figura 13), sin embargo, al obtener el peso seco de la biomasa se detectó que la biomasa obtenida en los tratamientos con glucosa duplicaba a la encontrada en los tratamientos con lactosa. Wu *et al.* observó un comportamiento similar en sus cultivos, donde el medio mixotrófico con lactosa presentó menor generación de biomasa producida en comparación al medio de cultivo mixotrófico con glucosa. Esto podría ser debido a que se ha reportado que las células de las microalgas como *Neochloris oleoabundans* presentan cambios en el tamaño celular conforme va avanzando en el ciclo de crecimiento, reproducción, situaciones de estrés e incluso por la acumulación de lípidos en su interior^{14,15}, por lo que probablemente los cultivos de lactosa presentaron menor número de células, pero con un tamaño celular mayor.

6.2 Producción de lípidos en medios de cultivo mixotróficos.

Los extractos lipídicos de agua dulce con glucosa obtuvieron menor porcentaje de rendimiento en comparación del medio de cultivo control, mientras que los medios de cultivo de agua dulce con lactosa obtuvieron mayor rendimiento. Este comportamiento también se observó en los medios mixotróficos salinos, por lo que los tratamientos con lactosa como fuente orgánica de carbono presentaron mayor producción de lípidos. Este comportamiento también fue reportado por Wu y colaboradores (2011)³⁰.

En otro estudio realizado en el 2014 por Beevi y Sukumaran, observaron la producción de lípidos y el perfil de los ácidos grasos al inocular a la microalga verde habitante de agua dulce *Chlorococcum sp.* RAP13 en condiciones mixotróficas utilizando el efluente de una planta productora de leche en la India⁴⁵. Los resultados mostraron que el cultivo mixotrófico presentó una producción mayor de biomasa y lípidos que el medio control en condiciones heterotróficas, lo cual también pudo observarse en nuestro estudio, donde los cultivos de medio dulce con lactosa presentaron un mayor porcentaje del rendimiento del extracto lipídico (DL5= 390% y DL10=267.86%) en comparación con el medio de cultivo control (82.26%).

Por otro lado, en el 2012 Abreu *et al.* realizó un estudio con la microalga verde *Chlorella vulgaris* cultivada en medios de cultivo mixotróficos con productos de desecho de una industria de productos lácteos. En dicho estudio observaron que la microalga *C. vulgaris* produjo menor cantidad de lípidos en el cultivo con producto lácteo no hidrolizado (10 g/L de lactosa) en comparación con el medio cultivo control⁴⁶. Esto puede deberse a que el producto de desecho lácteo no hidrolizado contiene otros nutrientes o moléculas que pudieron afectar a la producción de lípidos intracelulares de *C. vulgaris*.

En los cultivos mixotróficos con glucosa de *N. oleoabundans* que llevamos a cabo, obtuvimos rendimientos de extractos lipídicos de 42% en agua dulce con 5g/L de glucosa y 37% en los medios salinos con 5 y 10 g/L de glucosa. En estudios con microalgas verdes como *C. sorokiniana* se ha reportado que el rendimiento de la producción de lípidos en medios de cultivo mixotróficos con glucosa 4-10 g/L oscila entre un 45-51% aproximadamente⁴⁷⁴⁸. Esto podría ser debido a que, durante la fase estacionaria del crecimiento, las células aumentan el uso del carbono para estimular la producción de lípidos, por lo que el aprovechamiento de la glucosa en esta fase favorece el suministro de acetil-CoA y NADPH, que juegan un papel importante en la producción de lípidos y su posterior acumulación dentro de las células⁴⁹²³.

CAPÍTULO 07

CONCLUSIONES

Los medios de cultivo mixotróficos salinos con glucosa (S9G5 y S9G10) presentaron en sus curvas de crecimiento celular una mayor concentración (α), velocidad de reproducción ($\mu_{\text{máx}}$) y un menor tiempo de generación (G) en comparación con el medio control o el medio DG10 contaminado, pero estos últimos presentaron una fase de latencia (λ) más corta que los medios salinos con glucosa.

Los medios de cultivo mixotróficos con mayor producción de biomasa son los que contienen glucosa (DW 2.12 - 3.78 mg/mL), sin embargo, el rendimiento de lípidos que presentaron fue menor, siendo que los medios de cultivo mixotróficos de agua dulce y agua salina con lactosa (DL5, DL10, S9L5 y S9L10) presentaron mayores porcentajes de rendimiento lipídico del extracto (< 90%).

Con lo expuesto anteriormente, se puede concluir que los rendimientos lipídicos intracelulares obtenidos en los medios de cultivo mixotróficos utilizados en este trabajo presentaron similitudes con la literatura consultada, además de que no se obtuvo una producción suficiente de EPS en el medio, por lo que la hipótesis planteada en este proyecto se rechaza.

CAPÍTULO 08

PERSPECTIVAS

Esta investigación busca aportar más información sobre las características de crecimiento de la microalga *Neochloris oleoabundans* en diferentes medios de cultivo mixotróficos para futuras áreas de oportunidad.

Este proyecto puede complementarse con el aumento de volumen del medio de cultivo y utilizando diferentes tipos de biorreactores, con la finalidad de encontrar mejores condiciones para el crecimiento celular y producción de la biomasa generada por *N. oleoabundans*, así como la adición de métodos de cuantificación y caracterización de los lípidos intracelulares y exopolisacáridos producidos en tratamientos mixotróficos, tales como cromatografías y espectrofotometrías.

Finalmente, buscar posibles aplicaciones para los lípidos y EPS caracterizados de *N. oleoabundans*, realizando los ensayos correspondientes para confirmar dicha actividad.

CAPÍTULO 09

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 10. Mediciones de la concentración celular de *Neochloris oleoabundans* en medios de cultivo mixotróficos.

Día de Incubación	Horas en incubación	Numero de células/mL			
		Control	DG10*	S9G5	S9G10
0	0	1×10^4	1×10^4	1×10^4	1×10^4
1	24	1.5×10^4	1.25×10^4	1×10^4	1×10^4
2	48	1.05×10^5	4.25×10^4	2.5×10^4	3.25×10^4
5	120	2.6075×10^6	8.9×10^5	1.0525×10^6	2.35×10^5
6	144	4.62×10^6	4.0125×10^6	6.72×10^6	2.9125×10^6
7	168	6.7725×10^6	1.14075×10^7	1.86525×10^7	1.09575×10^7
8	192	9.4875×10^6	1.24575×10^7	2.794×10^7	2.1505×10^7
9	216	9.775×10^6	1.36425×10^7	5.3025×10^7	4.0425×10^7
12	288	1.53675×10^7	8.145×10^6	2.52875×10^7	2.227×10^7
13	312	1.4365×10^7	1.716×10^7	1.71585×10^8	3.2431×10^8
14	336	2.0705×10^7	2.323×10^7	1.13565×10^8	3.90945×10^8
15	360	2.06025×10^7	5.5275×10^7	1.190925×10^8	3.1356×10^8

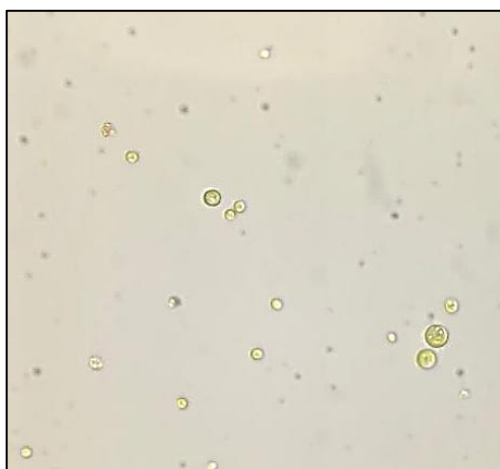


Figura 17. Células de *Neochloris oleoabundans* en condiciones control observadas en la cámara de Neubauer con el objetivo 40x.

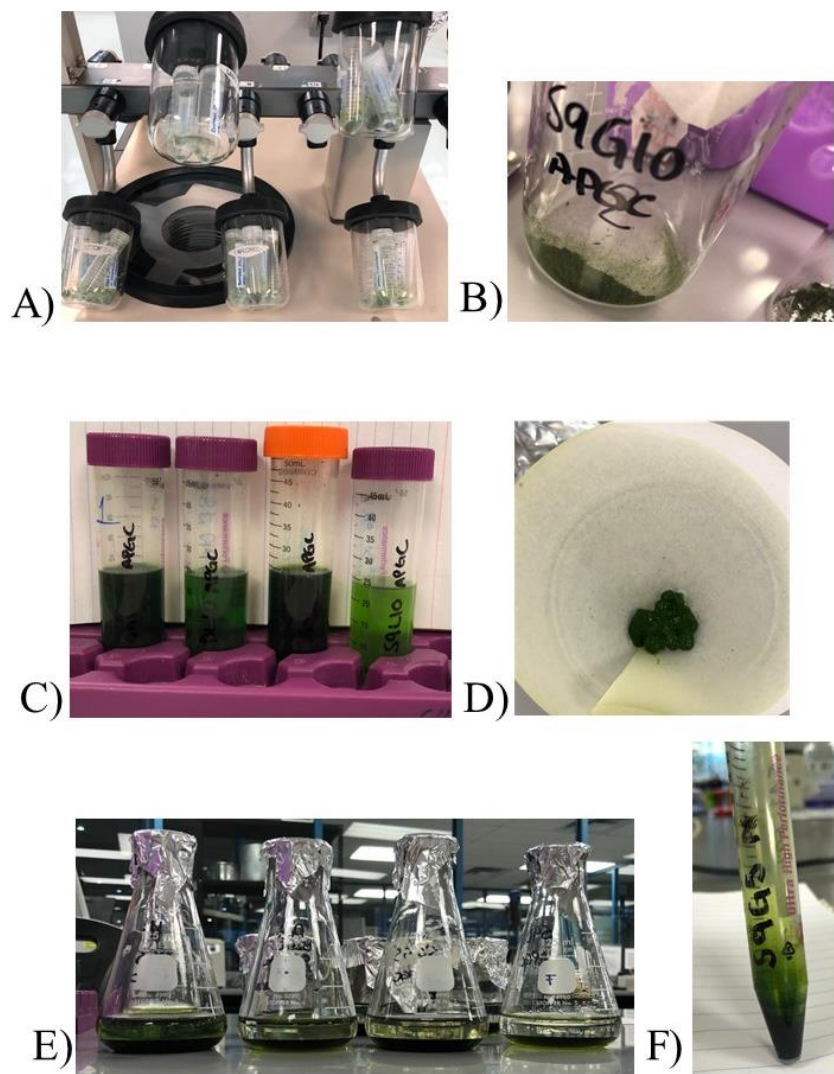


Figura 18. Imágenes tomadas durante el proceso de liofilización y extracción de lípidos:

A) biomasa en liofilización, B) biomasa de la microalga seca y homogenizada, C) extractos de la microalga con la mezcla de los solventes metanol, cloroformo y agua (relación 2:1:0.8), D) restos celulares filtrados posterior a la ruptura celular, E) formación del sistema bifásico en la extracción, F) extracto lipídico seco obtenido.

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFÍA

1. Enamala, M. K. *et al.* Production of biofuels from microalgae - A review on cultivation, harvesting, lipid extraction, and numerous applications of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **94**, 49–68 (2018).
2. Pruvost, J., Van Vooren, G., Le Gouic, B., Couzinet-Mossion, A. & Legrand, J. Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application. *Bioresour. Technol.* **102**, 150–158 (2011).
3. Egbo, M. K., Okoani, A. O. & Okoh, I. E. Photobioreactors for microalgae cultivation – An Overview. (2018).
4. Priyadarshani, I. & Rath, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Util.* **3**, 89–100 (2012).
5. Rajvanshi, M. *et al.* *Biomolecules from Microalgae for Commercial Applications. Sustainable Downstream Processing of Microalgae for Industrial Application* (2019). doi:10.1201/9780429027970-1
6. Bashir, K. M. I. & Choi, J. S. Clinical and physiological perspectives of β -glucans: The past, present, and future. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
7. Balder, H. F. *et al.* Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **15**, 717–725 (2006).
8. Begum, H., Yusoff, F. M. D., Banerjee, S., Khatoon, H. & Shariff, M. Availability and Utilization of Pigments from Microalgae. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 2209–2222 (2016).
9. Guzmán, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M. & Calleja, J. M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phyther. Res.* **17**, 665–670 (2003).

10. Fujitani, N., Sakaki, S., Yamaguchi, Y. & Takenaka, H. 微細藻類hyaluronidase Inhibition.Pdf. 489–492 (2001).
11. Ghasemi, Y., Moradian, A., Mohagheghzadeh, A., Shokravi, S. & Morowvat, M. H. Antifungal and Antibacterial activity of the MicroAlgae Collected from Paddy Fields of Iran. *Journal of Biological Sciences* **7**, 904–910 (2007).
12. Mehta, S. K. & Gaur, J. P. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: Progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **25**, 113–152 (2005).
13. Algae Products Market Size, Analysis, Trends, Growth And Forecast To 2027. Available at: <https://www.credenceresearch.com/report/algae-products-market>. (Accessed: 28th April 2020)
14. Chantanachat, S. & Bold, H. C. Phycological studies II. Some algae from arid soils. *Univ. Texas Publ.* **6218**, 1–74 (1962).
15. Komárek, R. Polynuclearity of vegetative cells in coccal green algae from the family neochloridaceae. *Arch. fur Protistenkd.* **137**, 255–273 (1989).
16. Neochloris oleoabundans S.Chantanachat & Bold :: Algaebase. Available at: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=45611&sk=0&from=results. (Accessed: 20th May 2019)
17. Ettlia oleoabundans (S.Chantanachat & Bold) J.Komárek 1989 :: Algaebase. Available at: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=43075. (Accessed: 26th April 2020)
18. Baudelet, P., Ricochon, G., Linder, M. & Muniglia, L. Review article A new insight into cell walls of Chlorophyta. *Algal Res.* **25**, 333–371 (2017).
19. Rashidi, B. & Trindade, L. M. Detailed biochemical and morphologic characteristics of the green microalga Neochloris oleoabundans cell wall. *Algal Res.* **35**, 152–159 (2018).
20. Markou, G., Vandamme, D. & Muylaert, K. Microalgal and cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. *Water Res.* **65**, 186–202 (2014).

21. Araujo, G. S. *et al.* Ultrasonics Sonochemistry Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application : Prospection of the optimal extraction method. *Ultrason. - Sonochemistry* **20**, 95–98 (2013).
22. Santoro, I. *et al.* Sustainable and selective extraction of lipids and bioactive compounds from microalgae. *Molecules* **24**, 1–13 (2019).
23. Jaeger, L. de *et al.* Neochloris oleoabundans is worth its salt: Transcriptomic analysis under salt and nitrogen stress. *PLoS One* **13**, 1–21 (2018).
24. Baldisserotto, C. *et al.* Photosynthetic aspects and lipid profiles in the mixotrophic alga Neochloris oleoabundans as useful parameters for biodiesel production. *ALGAL* **16**, 255–265 (2016).
25. Silva, H. R. *et al.* Combining glucose and sodium acetate improves the growth of Neochloris oleoabundans under mixotrophic conditions. *AMB Express* (2016). doi:10.1186/s13568-016-0180-5
26. Kumar, R. R., Rao, P. H. & Arumugam, M. Lipid extraction methods from microalgae : a comprehensive review. **2**, 1–9 (2015).
27. Kumar, D., Kaštánek, P. & Adhikary, S. P. Exopolysaccharides from cyanobacteria and microalgae and their commercial application. *Curr. Sci.* **115**, 234–241 (2018).
28. Xiao, R. & Zheng, Y. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1225–1244 (2016).
29. Delattre, C., Pierre, G., Laroche, C. & Michaud, P. Production, extraction and characterization of microalgal and cyanobacterial exopolysaccharides. *Biotechnol. Adv.* **34**, 1159–1179 (2016).
30. Wu, N., Li, Y. & Lan, C. Q. Production and Rheological Studies of Microalgal Extracellular Biopolymer from Lactose Using the Green Alga Neochloris oleoabundans. *J. Polym. Environ.* **19**, 935–942 (2011).
31. Moore, B. G. & Tischer, R. G. Extracellular Polysaccharides of Algae : Effects on life-support systems. *Science (80-.).* **145**, 586–587 (1964).

32. Yalcin, I., Hicsasmaz, Z., Boz, B. & Bozoglu, F. Characterisation of the extracellular polysaccharide from freshwater microalgae *Chlorella* sp. *LWT - Food Science and Technology* 158–165 (1994). doi:10.1006/fstl.1994.1032
33. Allard, B. & Casadevall, E. Carbohydrate composition and characterization of sugars from the green microalga *Botryococcus Braunii*. *Phytochemistry* **29**, 1875–1878 (1990).
34. Weiss, T. L. *et al.* Colony organization in the green alga *Botryococcus braunii* (Race B) is specified by a complex extracellular matrix. *Eukaryot. Cell* **11**, 1424–1440 (2012).
35. Blich, E. G. & Dyer, W. J. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**, 911–917 (1959).
36. Salim, S., Bosma, R., Vermuë, M. H. & Wijffels, R. H. Harvesting of microalgae by bio-flocculation. *J. Appl. Phycol.* **23**, 849–855 (2011).
37. Vazquez-Rodriguez, A. *et al.* Microbial Competition of *Rhodotorula mucilaginosa* UANL-001L and *E. Coli* increase biosynthesis of Non-Toxic Exopolysaccharide with Applications as a Wide-Spectrum Antimicrobial. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
38. Baldissarotto, C., Giovanardi, M., Ferroni, L. & Pancaldi, S. Growth, morphology and photosynthetic responses of *Neochloris oleoabundans* during cultivation in a mixotrophic brackish medium and subsequent starvation. *Acta Physiol. Plant.* **36**, 461–472 (2014).
39. Pang, N. *et al.* Exploiting mixotrophy for improving productivities of biomass and co-products of microalgae. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **112**, 450–460 (2019).
40. Kuhl, A. & Lorenzen, H. Hmdling Culturing. (1919).
41. EL-Sheekh, M. M., Bedaiwy, M. Y., Osman, M. E. & Ismail, M. M. Mixotrophic and heterotrophic growth of some microalgae using extract of fungal-treated wheat bran. *Int. J. Recycl. Org. Waste Agric.* **1**, 1–9 (2012).
42. Li, X., Li, W., Zhai, J. & Wei, H. Effect of nitrogen limitation on biochemical composition and photosynthetic performance for fed-batch mixotrophic cultivation

- of microalga *Spirulina platensis*. *Bioresour. Technol.* **263**, 555–561 (2018).
43. Guzman-Murillo, M. A. & Ascencio, F. Anti-adhesive activity of sulphated exopolysaccharides of microalgae on attachment of red sore disease-associated bacteria and *Helicobacter pylori* to tissue culture cells. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**, 473–478 (2000).
 44. Synytsya, A., Copíková, J., Kim, W. J. & Park, Y. I. Cell wall polysaccharides of marine algae. *Springer Handb. Mar. Biotechnol.* 543–590 (2015). doi:10.1007/978-3-642-53971-8_22
 45. Ummalyma, S. B. & Sukumaran, R. K. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. *Bioresour. Technol.* **165**, 295–301 (2014).
 46. Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J. & Dragone, G. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol.* **118**, 61–66 (2012).
 47. Li, T., Zheng, Y., Yu, L. & Chen, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. *Biomass and Bioenergy* **66**, 204–213 (2014).
 48. Wan, M. *et al.* The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 835–844 (2011).
 49. Chandra, R., Rohit, M. V., Swamy, Y. V. & Venkata Mohan, S. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. *Bioresour. Technol.* **165**, 279–287 (2014).

CAPÍTULO 11
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Ana Patricia Garza Chapa

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias
con Orientación en Microbiología Aplicada

Tesis:

Comparación en la producción de biopolímeros de alta densidad y lípidos intracelulares
a partir de la microalga *Neochloris oleoabundans*.

Campo de estudio:

Biotecnología y microbiología.

Datos personales:

Nacida en Monterrey, Nuevo León el 28 de noviembre de 1989,
hija de Fernando César Garza Benavides y Mayela Ludivina Chapa Guajardo.

Educación:

Egresada de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la UANL, 2012-2016.

